Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Über Empfindlichkeit und Aussagekraft des Mikrokerntests im Vergleich zur Chromosomenanalyse des Knochenmarks

Eine in vivo-Untersuchung an Chinesischen Hamstern mit Cyclophosphamid (Endoxan)

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Stephan Mohr

1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0002

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

ÜBER EMPFINDLICHKEIT UND AUSSAGEKRAFT DES MIKROKERNTESTS IM VERGLEICH ZUR CHROMOSOMENANALYSE DES KNOCHENMARKS

Eine in vivo-Untersuchung an Chinesischen Hamstern mit Cyclophosphamid (Endoxan)

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan M O H R ,

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf .

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Reinauer

Referent
gez.: Prof.Dr.Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof.Dr.Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	4
II.	Der Mikrokerntest	8
	1. Geschichtliches	8
	2. Definition, Entstehung und Eigenschaften der Mikrokerne	9
	3. Erythropoese	13
	4. Methodische Grundlagen des Tests	16
	5. Literatur	22
III.	Cyclophosphamid	24
	1. Medizinische Anwendung	24
	2. Pharmakokinetik und Pharmakologie	26
	3. Toxikologische Befunde	29
	4. Mutationsmechanismen	33
IV.	Material und Methoden	40
	1. Tiere	40
	2. Testsubstanz und Applikation	40
	3. Materialien	42
	4. Chromosomenanalyse des Knochenmarks	44
	a) Herstellung der Präparate	44
	b) Auswertungskriterien	45
	5. Mikrokerntest	55
	a) Herstellung der Präparate	55
	b) Auswertungskriterien	56
	6. Statistische Sicherung	58
V.	Ergebnisse	59
	1. Chromosomenanalyse des Knochenmarks	59
	2. Mikrokerntest	61
VI.	Diskussion	77
	1. Vergleich von Dosis- und Intervallabhängigkeit	77
	a) Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven	77
	b) Knochenmarksdepression	85

		Seite
	c) Literaturvergleich (Cyclophosphamid)	88
	d) Zusammenfassung	90
	2. Unterschiede zwischen Chromosomenanalyse und Mikrokerntest	91
	a) Informationsunterschiede	91
	b) Auswirkungen von Spindelstörungen	96
	c) Empfindlichkeitsunterschiede . .	99
	d) Differentialdiagnostische Schwierigkeiten / Zeitaufwand .	100
	e) Interspeciesvergleiche	102
	f) Zusammenfassung	103
	3. Aussagekraft und Anwendbarkeit des Mikrokerntests	105
VII.	Zusammenfassung	114
VIII.	Literaturverzeichnis	116
	Erklärung	129
	Lebenslauf	130

I. Einleitung

Neu entwickelte Methoden, deren Objektivität und Brauchbarkeit für wissenschaftliche Zwecke getestet werden sollen, müssen sich hinsichtlich zweier Merkmale besonders bewähren: zum einen müssen sie tatsächlich jene Kriterien erfassen, für deren Messung sie geschaffen wurden (Merkmal der Gültigkeit, Validität), zum anderen sollen sie quantitativ möglichst exakte und beliebig oft reproduzierbare, stabile Daten liefern, die sich auf diese Kriterien beziehen (Merkmal der Zuverlässigkeit, Reliabilität). Der hier zur Diskussion stehende Mikrokerntest, von BOLLER und SCHMID (1970) als Kernanomalietest erstmals vorgestellt und von SCHMID (1972, 1973 und 1975) für die schnelle Routinetestung chemisch induzierter Mutationen weiterentwickelt, bereitet hinsichtlich der Beurteilung dieser Merkmale einige spezifische Schwierigkeiten, die bisher noch nicht eingehend in einer umfassenden Arbeit erörtert worden sind.

Die Validität einer Methode ist nur dann bestimmbar, wenn zuvor das, was valide (gültig) sein soll, festgelegt wurde. Im Hinblick auf die cytogenetisch ausgerichtete Mutationsforschung, die mit dem Mikrokerntest mutagene Effekte an Säugetierorganismen nachweisen möchte, kann dies nur das genaue Erfassen von Chromosomen- und Genommutationen sein. Insofern der Mikrokerntest aber nur mittelbarer Indikator für chromosomale Fragmente und versprengte Chromosomen ist - indem er das Auftreten von Mikrokernen in Knochenmark-Erythrozyten quantitativ auswertet - und nicht ausdrücklich das Chromosomenmaterial selbst analysiert, wird die Beurteilung seiner Validität bereits problematisch.

Nicht nur deshalb muß die Chromosomenanalyse des Knochenmarks, die lange vor Erscheinen des Mikrokerntests im Erfassen von Chromosomen- und Genommutationen Gültigkeits- und Qualitätsmaßstäbe gesetzt hat, zu einem Vergleich bemüht werden. Auch alle anderen Kriterien, die zur Beurteilung des Mikrokerntests bzw. seiner Aussagekraft notwendig sind, (Reliabilität, Informationsfülle, Differenziertheit, statistische

Verfügbarkeit der Daten, Empfindlichkeit, systematische Fehler und technische Eigenschaften), sind nur dann sinnvoll zu werten, wenn sie in gleicher Weise auch auf die Standardmethode der Cytogenetik, die Chromosomenanalyse, angewandt werden. Die Tatsache, daß beide Methoden nach lichtmikroskopisch sichtbaren Folgen mutagener Einwirkungen fahnden und dabei dasselbe Ausgangsmaterial, nämlich Zellen des blutbildenden Femur-Knochenmarks von Laboratoriumssäugern, zur Objektivierung somatischer Mutationen verwerten, wirkt sich dabei recht vorteilhaft aus.

Der naheliegende Versuch, Mikrokerntest und Chromosomenanalyse des Knochenmarks möglichst unmittelbar miteinander zu vergleichen, bringt indessen auch einige Probleme mit sich, die ihrerseits mit der Gesamtthematik dieser Arbeit eng verknüpft sind. Wenn im Mikrokerntest nach Mikrokernen in jungen Knochenmark-Erythrozyten und in der Chromosomenanalyse des Knochenmarks nach chromosomalen Aberrationen in Blutstammzell-Metaphasen gefahndet wird, so sind es nicht nur zwei unterschiedliche Zellpopulationen, die dabei zur Auswertung gelangen.

Vielmehr scheint mit der Verlagerung des Interesses auf cytologische Alterationen im Mikrokerntest bereits auch der Schritt vom Genotyp (chromosomale Aberrationen) zum Phänotyp (Mikrokerne) vollzogen zu sein. Mit diesem Schritt aber gerät nicht nur der Begriff der (chromosomalen) Mutation in Gefahr, auf cytologische Nachfolgeerscheinungen ausgedehnt und damit überstrapaziert zu werden, sondern scheint auch - so die Vermutung - der Bereich cytogenetischer Objektnähe und Informationsfülle verlassen und ein Bereich minderer Differenziertheit erreicht zu sein, dessen Effizienz hinsichtlich der Beurteilung von Chromosomen- und Genommutationen erst noch zu beweisen wäre. Der Verdacht, mit demselben Schritte sei auch eine Minderung der Empfindlichkeit verbunden und das Defizit an Informationen gegenüber der Chromosomenanalyse

könne auch die Validität und letzten Endes die Aussagekraft des Mikrokerntests negativ beeinflussen, nährte sich indessen nicht aus Beobachtungen und Ergebnissen, die a.a.O. experimentell gewonnen wurden.

Vielmehr waren es Grundsatzarbeiten zum Phänomen der Mikrokerne (vgl. Kap. II), die Zweifel aufkommen ließen: EVANS u. Mitarb. (1959) fanden bei Untersuchungen strahleninduzierter Mutationen heraus, daß nur etwa 60 % der induzierten Chromosomenbrüche und -fragmente tatsächlich zu Mikrokernen führen, während ein beträchtlicher Teil dieser Aberrationen in den Tochter-Zellkernen verblieb oder erst in der Mehrzahl einen einzigen Mikrokern ergab. GERNAN und CRIPPA (zitiert bei SCHROEDER, 1970) ermittelten den Quotienten aus Kernanomalien und Chromosomenaberrationen und erhielten starke Schwankungen dieses Quotienten nach oben wie nach unten. Dabei ermittelten sie Tiefstwerte von 41 %, d.h. daß sich im Extremfall auf 5 Chromosomenaberrationen nur 2 Mikrokerne finden ließen. SCHROEDER selbst (1970) gab eine Anzahl von Chromosomenaberrationen an, die grundsätzlich unfähig sein sollen, überhaupt Mikrokerne auszubilden (vgl. Kap. VI. 2.a). Schließlich merkten auch NICHOLS u. Mitarb. (1972) an, daß Schnelligkeit und Leichtigkeit, mit denen Präparation und Auswertung des Mikrokerntests verbunden sind, notwendigerweise auch mit einer geringeren Sensibilität dieser Methode erkauft werden müssen.

Andere Autoren (SCHMID, 1972, 1973 und 1975 a und b; WEBER u. Mitarb., 1975 u.a.) halten im Gegensatz dazu den Mikrokerntest für ebenso empfindlich und brauchbar wie die Chromosomenanalyse, was sie allerdings meist nicht in Simultan-Untersuchungen beider Methoden belegen. Zwischen der Ebenbürtigkeit beider Methoden, von welcher sie ausgehen und der theoretisch abgeleiteten Überlegung, der Mikrokerntest müsse zwingenderweise weniger effektiv sein

als die Chromosomenanalyse, was z.B. auch NICHOLS und Mitarb. (1972) annahmen, liegt ein beträchtlicher Widerspruch. Die vorliegende Arbeit soll die Gründe für diesen Widerspruch herausfinden und selbst zur Empfindlichkeit und Aussagekraft des Mikrokerntests im Vergleich zur Chromosomenanalyse des Knochenmarks Stellung nehmen.

Bei der Planung dieser Arbeit spielten folgende Gesichtspunkte eine Rolle:

1. Die interessierenden Eigenschaften des Mikrokerntests können sinnvollerweise nur mit den Eigenschaften der Chromosomenanalyse des Knochenmarks als Standardmethode gemessen werden.

2. Um den Vergleich so unmittelbar wie möglich zu gestalten, war die Zahl störender Variablen zu beschränken. So bot sich u.a. das sicher und stark mutagene Zytostatikum Cyclophosphamid als Testsubstanz an.

3. Es sollte geprüft werden, ob im Zuge der Minderung der Variablen eine simultane Anwendung von Mikrokerntest und Chromosomenanalyse an jeweils einem Tier möglich ist (Ausschaltung pharmakokinetischer Unterschiede).

4. Die in beiden Methoden erreichbaren Informationsmöglichkeiten sollten, um zu einer gültigen Aussage zu gelangen, voll ausgenutzt werden. Um mit der Chromosomenanalyse auch Gaps und Brüche zu erfassen, wurde auf ein Chromosomen-Banding verzichtet. Die vom Ad hoc-Kommitee der Environmental Mutagen Society 1972 vorgeschlagene Zahl der in der Chromosomenanalyse pro Tier auszuwertenden Metaphasen wurde außerdem auf das Doppelte erhöht, um größere Zahlen zu erhalten.

5. Unter Ausnutzung dieser Möglichkeiten sollten Dosis-Effekt-Beziehungen ermittelt werden, um so zu einer Beurteilung der Empfindlichkeit des Mikrokerntests im Vergleich zur Chromosomenanalyse des Knochenmarks zu gelangen.

6. Anhand dieser Kriterien sollten schließlich auch neue Aspekte zur Aussagekraft des Mikrokerntests im Vergleich zur Chromosomenanalyse gewonnen werden.

Die Frage, was der Mikrokerntest eigentlich ist und welche biologischen Gegebenheiten er ausnutzt, um auf seine Weise Chromosomen- und Genommutationen nachweisen zu können, soll im folgenden Kapitel erörtert werden.

II. Der Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist eine in vivo-Methode zur indirekten Darstellung von Mutationen in Knochenmarkzellen. Er geht von der Beobachtung aus, daß in (technisch einfach herstellbaren) Knochenmarkausstrichen mutagene Schädigungen mit dem Erscheinen von Mikrokernen in jungen Erythrozyten verbunden sind. Mit der Messung ihres Auftretens ist eine Abschätzung der im Erbmaterial zugrundeliegenden Mutationen bzw. chromosomalen Aberrationen möglich.

1.) Geschichtliches

Die erstmalige Registrierung von Mikrokernen als morphologisch sichtbaren Folgen mutagener Schädigung dürfte THODAY (1951) zuzuschreiben sein, der an verschiedenen Pflanzen strahlengenetische Experimente durchgeführt hatte. In der Mutationsforschung griff man das Phänomen der Mikrokerne erst später auf, und zwar zu einem Zeitpunkt, als es für die Routinetestung vieler Substanzen notwendig geworden war, Testverfahren zu entwickeln, mit denen sich die Zahl der Extrapolationen, z.B. von Species zu Species, vermindern und komplizierte Aufarbeitungs- bzw. Auswertungstechniken vereinfachen ließen.

So schlug SCHROEDER (1966) vor, Kernanomalien in Knochenmarkausstrichen zur indirekten Abschätzung chromosomaler Aberrationen heranzuziehen. In einer weiteren Arbeit (1970)

bezeichnete sie die hämatologische Beurteilung von Knochenmarkausstrichen ausdrücklich als brauchbare Methode zur Erfassung mutagener Schäden. Im gleichen Jahr veröffentlichten BOLLER und SCHMID (1970) bereits Ergebnisse, die aus einer solchen Knochenmarksauswertung stammten. Sie hatten unter methodologischer Fragestellung Chinesische Hamster mit Triaziquon (Trenimon) behandelt.

Da die umfassende hämatologische Beurteilung aller Kernanomalien anspruchsvoll und zeitraubend war, modifizierten MATTER und SCHMID (1971) sowie VON LEDEBUR und SCHMID (1973) die Auswertungsart der Kernanomalien, bis sie SCHMID (1975 a u. b) endgültig auf die Zählung mikrokernhaltiger poly- und normochromatischer Erythrozyten reduzierte. Die von SCHMID 1975 standardisierte Version des Mikrokerntests wird heute allgemein angewandt und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.) Definition, Entstehung und Eigenschaften der Mikrokerne.

Mikrokerne sind kernähnliche Gebilde von 1/20 bis 1/5 des Zelldurchmessers (SCHMID, 1975 a) und enthalten chromatinhaltiges Material. Sie treten vereinzelt oder in der Mehrzahl auf und haben eine runde, selten eine halbmondförmige oder sogar bizarre Gestalt . Beim Menschen ist ihr Erscheinen in Form sogenannter JOLLY-Körperchen bekannt bei schweren Anämien, bei Megaloblastose, als Folge gestörter Entkernung der Normoblasten (wobei nicht eigentlich echte Mikrokerne entstehen), bei traumatischen Eröffnungen blutbildender Markhöhlen sowie bei Milzagenesie, -atrophie, -unterfunktion oder -exstirpation mit konsekutiver überstürzter Erythropoese. Letztere wird dadurch herbeigeführt, daß die hemmende Wirkung der Milz auf das Knochenmark entfällt oder mindestens herabgesetzt ist. Auch nach Methotrexat- bzw. 6-Mercaptopurintherapie (LAMPERT, 1967), Vincristinbehandlung (KUNDEL und NIESS, 1965) und Langzeitbestrahlungen

wurden beim Menschen Mikrokerne beobachtet (WITKOWSKI und ANGER, 1967). Da Mikrokerne nicht nur bei Säugern, sondern auch bei Amphibien und verschiedensten Pflanzen beobachtet wurden, scheinen sie generell eine Reaktion eukaryontischer Lebewesen auf chromosomenschädigende Noxen darzustellen .

Mikrokerne entstehen durch chromosomale Aberrationen oder durch Verteilungsstörungen im Verlauf der Mitose. EVANS u. Mitarb. (1959) führen sie beispielsweise zurück auf "Chromatidbrüche, Chromosomenbrüche, Isochromatidbrüche sowie asymmetrische und inkomplette symmetrische Austauschfiguren", während SCHROEDER (1970) neben azentrischen Fragmenten auch dizentrische Chromosomen erwähnt, die zur Mikrokernbildung fähig sein sollen.

Die Entstehung der Mikrokerne läuft dabei - außer bei primären Spindelstörungen - folgendermaßen ab: Chromosomenaberrationen der oben beschriebenen Art hinterlassen Fragmente, die weder ein Zentromer noch zentromernahe, hoch repetitive DNS-Abschnitte aufweisen. Da diese Fragmente während der Mitose nicht fähig sind, eigene Spindelfasern auszubilden (vgl. NAGL, 1972). bzw. sich an solche zu heften, können sie in der Anaphase auch nicht zu den Zellpolen transportiert werden: sie bleiben in der Metaphasenebene liegen. Die anschließende Telophase ist dadurch gekennzeichnet, daß sich die Chromosomen der Tochterkerne mit Hilfe eines Plasmafaktors wieder entspiralisieren und die Bildung von Kernmembranen veranlassen. Da sich die liegengebliebenen Fragmente stofflich in keiner Weise vom Chromatinmaterial der sich konstituierenden Tochterzellkerne unterscheiden, werden auch sie mit analogen Kernmambranen umgeben. Diese lassen sich selbst elektronenmikroskopisch nichtvon den Membranen normaler Zellkerne abgrenzen (BESSIS, 1973). Nach Einschnürung und Durchtrennung des Cytoplasmas der Mutterzelle, d.h. in der Interphase, werden die so ummantelten Fragmente als

Mikrokerne sichtbar, wobei es dem Zufall überlassen bleibt, auf welche der beiden Tochterzellen sie verteilt werden.

Der Primärdefekt, der zur Entstehung der Mikrokerne führt, ist nicht immer in strukturellen Aberrationen zu suchen. Wie eben schon angedeutet, verursachen auch Spindelstörungen die Entstehung von Mikrokernen. Dabei werden infolge einer partiellen Insuffizienz des mitotischen Apparates einzelne Chromosomen weder längsgeteilt, noch zu den Zellpolen transportiert. Sie verhalten sich in der Folge genauso wie die oben beschriebenen Chromosomenfragmente. Wie häufig Mikrokerne durch Spindelstörungen und nicht durch strukturelle Aberrationen verursacht werden, ist bisher wenig erforscht. Wahrscheinlich hängt der Anteil der durch Spindel- und Verteilungsstörungen induzierten Mikrokerne von der Art der mutagenen Substanz ab: während er bei Triaziquon und Cyclophosphamid sehr niedrig sein dürfte, ist er bei MBC (Methylbenzimidazolylcarbamat) nahezu 100 Prozent, wie SEILER (1976) herausfand.

Einige Autoren rechnen zu den Mikrokernen auch die cytologischen Korrelate von Entkernungsstörungen. UNDRITZ (1952) beispielsweise bezeichnet auch pyknotische Kerne mit einem Durchmesser von 2 - 3 µ als Mikrokerne, während BESSIS (1973) seinerseits keinerlei begriffliche Unterscheidung zwischen echten HOWELL-JOLLY-Körperchen und typischen Karyorhexis-Körperchen in Erythrozyten vornimmt. Da Pyknosis und Karyorhexis keine spezifischen Mutationsäquivalente darstellen und größtenteils auch morphologisch identifiziert werden können, sollte man sie im Rahmen der Mutagenitätstestung zweckmäßigerweise beim Namen nennen und nicht den Mikrokernen zuordnen. Schließlich benennt SEILER (1976) auch riesige Gebilde vom halben Durchmesser einer Zelle als Mikrokerne, wobei er sie als Folge von Verteilungsstörungen kennzeichnet.

Auch sie sollen in diesem Rahmen per exclusionem (sie sind größer als 1/5 des Zelldurchmessers) nicht hinzugerechnet werden.

Das in den Mikrokernen enthaltene Chromatinmaterial ist von unterschiedlicher Quantität (was in den verschiedenen Durchmessern der Mikrokerne zum Ausdruck kommt) und von unterschiedlicher Qualität: es kann aus Euchromatin, Heterochromatin oder Nucleolusorganisator-Material bzw. aus beliebigen Kombinationen dieser drei Typen bestehen. Wenn Mikrokerne heterochromatisches und Nucleolusorganisator-Material enthalten, sind sie nach McLEISH (1954) nicht nur auf lange Sicht lebensfähig, sondern können auch mit verbleibenden Hauptkernen mitotisch synchronisiert werden. Jener Plasmafaktor, der für die Auflösung der Kernmembran und wahrscheinlich auch für die Ausbildung von Polen und Spindel verantwortlich ist (IKEUCHI u. Mitarb., 1972), löst dabei in der Prophase auch die Mikrokernmembran auf. In der Folge laufen dann alle mitotischen Vorgänge gleichsinnig ab. Unabhängig davon, daß Haupt- und Mikrokern räumlich oft miteinander assoziiert sind, gipfeln solche Synchronisierungsvorgänge zuweilen in echten Fusionen, nach welchen der Mikrokern optisch ganz aus der Zelle verschwindet (McLEISH, 1954).

Ist dieser Vorgang bisher nur selten nachgewiesen worden, so treten andererseits vorzeitige Chromosomenkondensationen (pcc = premature chromosome condensation) in Metaphasepräparationen häufiger auf. Diese leiten sich von unvollkommen synchronisierten Chromatinkompartimenten einer Zelle (Haupt- und Mikrokern z.B.) ab, wobei das zuerst in der Prophase befindliche Kompartiment mit Hilfe des Plasmafaktors zu einer vorzeitigen Spiralisierung des anderen Kompartiments (aus der G_1-,S- oder G_2-Phase heraus) führt. Die Folge sind staub-, punkt- oder

strickleiterförmige "Chromosomen"-strukturen, die zwischen normal spiralisierten Metaphasechromosomen auftreten und als Hinweise für getrennte Chromatinareale einer Zelle, z.B. auch für einen zusätzlichen Mikrokern, gelten können (vgl. u.a. IKEUCHI und Mitarb., 1972; IKEUCHI, 1973; KÜRTEN u. OBE, 1975; WITKOWSKI u. ANGER, 1976).

3.) Erythropoese

Für den Mikrokerntest sind die reiferen Erythropoesezellen des Knochemarks von Laboratoriumssäugern kurz vor und kurz nach der Zellkernausstoßung interessant. Die Frage liegt nahe, warum gerade die Zellen des erythropoetischen Systems für den Mikrokerntest so geeignet sind und an welcher Stelle der Erythropoese die entstandenen Mikrokerne für den Test relevant werden. Mit der Vergegenwärtigung dessen, was in der Erythropoese des Säugers geschieht, scheint die Beantwortung dieser Fragen leicht zu sein.

Vorangestellt sei ein von BESSIS (1973) stammendes Schema der menschlichen Erythropoese, das ohne Bedenken als Modell für die Erythropoese der Laboratoriumssäuger herangezogen werden konnte (Tab. 1). Es wurde insofern modifiziert, als die Dauer der einzelnen Reifungsschritte, beim Laboratoriumssäuger um ein Drittel kürzer als beim Menschen (SCHMID, 1975 b), hinzugefügt und die von BESSIS benutzte Nomenklatur um einige gebräuchliche Synonyma anderer Nomenklaturen ergänzt wurde. Die Nomenklatur von BESSIS nimmt Rücksicht auf das Kern- und Teilungsverhalten der erythropoetischen Zellen, während einige andere Synonyma eher beschreibend auf den Hämoglobin- bzw. Basophilie-Gehalt der Zellen bezogen sind, womit eine eindeutige Zuordnung der Begriffe nicht gewährleistet ist.

Tab. 1 Reifungsstufen der Erythropoese

Reifungsstadium (BESSIS)	Andere Nomenklaturen	Durchschnittl. Lebensdauer Mensch	Lebensdauer Säuger	Hämoglobingehalt (pg)
Proerythroblast	-	20 h	?	0,0 - 14,4
		Mitose		
Basophiler Erythroblast I	Erythroblasten	20 h	12-14h	7,2 - 21,6
		Mitose		
Basophiler Erythroblast II	Makroblasten	20 h	12-14 h	10,8- 25,2
		Mitose		
Polychromatischer Erythroblast I	Normoblasten a) basophil b) polychrom.	25 h	12-14h	12,6- 27,0
		Mitose		
Polychromatischer Erythroblast II	c) oxyphil	30 h	2- 4h	13,5- 24,5
		Kernausstoßung		
Proerythrozyt	Retikulozyt als Artefakt Polychromat. Erythrozyt (SCHMID)	3 d	24-36h	24,5- 30,0
Erythrozyt	Normozyt Normochromat. Erythrozyt (SCHMID)	120 d	?	30,0- 34,0

Kern- und Cytoplasmareifung fallen ohnehin des öfteren zeitlich auseinander.

Im Einzelnen ist die Entwicklung der roten Blutkörperchen von den Proerythroblasten zu den Erythrozyten durch folgende Veränderungen charakterisiert: Ursprünglich große Zellen mit ebenfalls großem, lockeren Kern zeigen infolge ihres hohen RNS-Gehaltes ein basophiles Cytoplasma. Von Stufe zu Stufe wird die Zelle kleiner. In dem Maße, in welchem Hämoglobin eingelagert wird, verliert sich die Basophilie des Cytoplasmas, wobei die rötliche Aufhellung perinukleär beginnt. Nach vier Teilungsschritten stößt der polychromatische Erythroblast II (Normoblast) in einer etwa 10minütigen Prozedur seinen Kern aus. Dieser wird bald von Retikulumzellen oder Histiozyten phagozytiert. Die Ausstoßung des Kerns erinnert an postmitotische Cytoplasmateilungen, da der Kern immer mit einem Cytoplasmasaum und einigen Zellorganellen unter aktiven Konvulsionen vom übrigen Großteil des Cytoplasmas getrennt und nicht nackt ausgestoßen wird. Die oben beschriebenen Karyorhexis-Gebilde stellen eine pathologische Variante der Kernausstoßung dar. Eine Lysis, d.h. eine Auflösung des Kerns mit signifikanter Abnahme der DNS, wurde ebenfalls als pathologische Abweichung beobachtet.

Das basophile Material der kernlosen Zellen wird mit der Zeit immer dünner und lockerer und verliert sich schließlich ganz. Indem zusätzlich die Mitochondrien vakuolisiert werden und nach Verlust ihrer cristae auch kaum mehr Stoffwechselprozesse zulassen, entstehen aus diesen Zellen junge Erythrozyten. Der Endpunkt ist nach 24 bis 36 Stunden erreicht, wenn die Zellen überhaupt keine Mitochondrien und präzipitierbare Ribosomen mehr enthalten: aus polychromatischen sind normochromatische Erythrozyten geworden.

In den folgenden 36 bis 48 Stunden schließt sich die Wanderung der jungen Erythrozyten durch Intra- oder Interzellularlücken des Endothels an, durch das der Weg in die Venensinus des Knochenmarks und damit in die Peripherie frei wird.

4.) Methodische Grundlagen des Tests

Das Interesse des Mikrokerntests richtet sich auf die beiden letzten Stufen der Erythropoese, die Proerythrozyten bzw. polychromatischen Erythrozyten und die Erythrozyten bzw. normochromatischen Erythrozyten, welche sich beide auf Grund ihrer Kernlosigkeit sehr gut für eine schnelle und sichere Mikrokernauswertung eignen. Die zeitlichen Verhältnisse von Mutationsauslösung, Mikrokernbildung, Kernausstoßung und schließlich Präsentation mikrokernhaltiger Erythrozyten sind bei diesen Zellen ebenfalls vorteilhaft: treten Mikrokerne in Proerythrozyten, d.h. polychromatischen Erythrozyten auf, so ist angesichts der im Mikrokerntest standardisierten Applikations- und Aufarbeitungsintervalle zwingenderweise anzunehmen, daß die Mikrokernauslösung stattgefunden haben muß, als sich diese Zellen im Stadium der polychromatischen Erythroblasten befanden, und daß - auf den Mutationsauslöser bezogen - mit hoher Wahrscheinlichkeit das mutagene Agens für die induzierten Mutationen verantwortlich zu machen ist. Auf andere Art und Weise ließe sich das massive Auftreten der Mikrokerne speziell in polychromatischen Erythrozyten nicht erklären. Die angedeuteten zeitlichen Verhältnisse sind in Tab. 2 festgehalten, welche zweckmäßigerweise im Zusammenhang mit Tab. 1 interpretiert werden sollte. Beide Tabellen machen u.a. auch deutlich, daß in sehr frühen

Reifungsstadien erzeugte Mikrokerne nicht zur Auswertung gelangen können, da sie selbst noch nach 36stündigem Intervall (welches in der vorliegenden Arbeit abgewartet wurde) in kernhaltigen Erythrozytenvorläufern, beispielsweise den basophilen Erythroblasten, als "vorzeitige Mikrokerne" versteckt sind. Weiterhin läßt sich aus diesen Tabellen ableiten, daß reife Erythrozyten kaum Mikrokerne enthalten dürften, da die letzten Zellen, die zu deren Ausbildung noch fähig waren (polychromatische Erythroblasten I und II), keinerlei Chance hatten, im angegebenen 36-Stunden-Intervall auszureifen und sich dem Untersucher als mikrokernhaltige normochromatische Erythrozyten zu präsentieren. Daß Proerythrozyten und Erythrozyten selbst keine Mikrokerne mehr ausbilden können, ist selbstverständlich, da sie ihren Kern bereits ausgestoßen haben.

Tab. 2 Zeitliche Verhältnisse im Mikrokerntest

Reifungsstadium der Zelle zum Zeitpunkt der Applikation	Vermutetes Reifungsstadium der Zelle nach Applikations- und Aufarbeitungsintervall von 36 Stunden	Mikrokerne im Mikrokerntest
Proerythroblast	Polychromatischer Erythroblast I	Teilweise als "vorzeitige Mikrokerne" in Erythroblasten sichtbar. Werden vernachlässigt.
Basophiler Erythroblast I	Polychromatischer Erythroblast II	
Basophiler Erythroblast II	Proerythrozyt kurz nach der Kernausstoßung	Frühestmögl. Auftreten in polychromatischen Erythrozyten
Polychromatischer Erythroblast I	Proerythrozyt	Typische Mikrokerne in polychromatischen Erythrozyten
Polychromatischer Erythroblast II	Proerythrozyt	
Proerythrozyt	Erythrozyt	Keine Mikrokerne möglich
Erythrozyt	Erythrozyt	

Zu den im Mikrokerntest relevanten Zellen müssen noch einige nomenklatorisch-differentialdiagnostische Anmerkungen gemacht werden, da zwischen den poly- und normochromatischen Erythrozyten einerseits und den sogenannten Retikulozyten andererseits des öfteren Unterscheidungsschwierigkeiten bestehen. Retikulozyten werden in der klinischen Hämatologie zum Nachweis einer gesteigerten Erythrozytenregeneration in Ausstrichen peripheren Blutes ausgezählt. Sie sind mit der Brillantkresylblau-Färbung an den dunkelblauen Granulationen der Substantia granulo-reticulofilamentosa zu erkennen und machen bei gesunden Erwachsenen 4 bis 15 °/oo (RICK, 1974) aller peripheren Erythrozyten aus.

Es besteht allgemeines Einverständnis darüber, daß das als Substantia granulo-reticulofilamentosa bezeichnete, charakteristische Ribosomennetzwerk der Retikulozyten auf eine artefizielle Präzipitation der Ribosomen während des Trocknungsvorganges (BESSIS, 1973) bzw. auf den Einfluß der Vitalfarbstoffe (MÜLLER-SEIFERT, 1966) zurückzuführen ist. Dagegen besteht einige Unklarheit über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Retikulozyten in der klinischen Hämatologie und den Proerythrozyten bzw. Erythrozyten im Mikrokerntest, die zum Teil ebenfalls basophile Granulationen aufweisen, jedoch nicht mit Brillantkresylblau angefärbt werden.

Die Verwirrung rührt daher, daß über die Umwandlung der homogen bläulich-rosafarbenen Proerythrozyten in reife, rote Erythrozyten hinaus manche Zellen immer noch Reste basophilen Materials, die in vivo unsichtbar sind, mit sich herumtragen. Diese Reste präzipitieren infolge des Trocknungsvorganges während der Präparateherstellung und werden deshalb in Knochenmarkausstrichen (Mikrokerntest) als mehr oder weniger unklar konturierte, blaue Zellbestandteile bzw. in Blutausstrichen (klinische

Hämatologie) als Substantia granulo-reticulofilamentosa der Retikulozyten sichtbar.

Folgendes ist also festzuhalten:
a) Retikulozyten bzw. Knochenmark-Erythrozyten mit basophilen Granulationen können nur durch die artefizielle Verklumpung ihres basophilen Materials als solche erkannt werden.
b) Beide Zelltypen sind nicht als obligate Stufen innerhalb der erythropoetischen Reihe aufzufassen, da die Überzahl analoger Zellen keine basophilen Reste enthalten und daher auch keine präzipitierten Granulationen ausbilden können.
c) Zwischen Retikulozyten auf der einen Seite und Proerythrozyten auf der anderen Seite bestehen stofflich keine Unterschiede. Ungeachtet dessen sollte die nomenklatorische Differenzierung zwischen diesen beiden Zelltypen - in verschiedenen Disziplinen in unterschiedlichen Zusammenhängen entstanden- zweckmäßigerweise beibehalten werden.

Da auch zwischen polychromatischen und normochromatischen Erythrozyten im Mikrokerntest mitunter differenziert werden muß, seien jene Merkmale, die beide Zelltypen voneinander trennen, hier ebenfalls erwähnt. Polychromatische Erythrozyten nehmen nach MAY-GRÜNWALD- und GIEMSA-Färbung einen Blaustich an, da sie noch homogen verteilte, basophile Substanz enthalten, sind größer (9 bis 10 µ) als die reifen Erythrozyten (7 bis 8 µ) und besitzen eine zu unregelmäßige äußere Rundung, als daß man sie schon für reife Blutkörperchen halten könnte.

Über die Prognose der Mikrokerne und mikrokernhaltigen Zellen ist in der Literatur nichts Genaues zu erfahren. Während die oben vorgestellten Befunde von McLEISH (1954), nach denen Mikrokerne mit besonderen Chromosomenabschnitten länger lebensfähig sein sollen, an Pflanzen erhoben

wurden, sind die einzigen Aussagen hierzu, Knochenmark-Erythrozyten betreffend, bei MATTER u. Mitarb. (1974, in einem Anhang) zu finden. Danach sollen Mikrokerne nur kurze Zeit in den Erythrozyten verweilen, so daß sie schon "verloren" seien, bevor die Zellen in die periphere Blutbahn eintreten. Die Frage nach der Lebensdauer der Mikrokerne und der Möglichkeit der sie tragenden Zellen, sie tatsächlich zu eliminieren, ist damit nicht hinreichend beantwortet.

Ebenso unklar ist noch die Frage, ob an der Knochenmark-Endothelschranke in gleicher Weise, wie reife und unreife, kernhaltige und nicht kernhaltige Zellen erkannt und selektiv durchgelassen werden, nicht auch mikrokernhaltige Zellen identifiziert und am Verlassen des Knochenmarks gehindert werden können. BOLLER und SCHMID (1970) konnten im peripheren Blut Trenimon-behandelter Chinesischer Hamster jedenfalls keine nennenswerte Erhöhung der Mikrokernrate feststellen, während die Rate im Knochenmark parallel dazu stark zunahm. Daß die in der Peripherie gefundenen Mikrokerne im Durchschnitt viel kleiner waren als die im Knochenmark gefundenen (Extremgrößen wurden nie beobachtet), kann dabei leider nicht als Beweis für eine Emigrationsauslese an der Knochenmark-Endothelschranke angesehen werden. Schließlich könnte eine Elimination mikrokernhaltiger Zellen auch in der Milz im Sinne einer Abfilterung erfolgen. Spielte die Knochenmark-Endothelschranke aber tatsächlich die entscheidende Rolle, so müßte - vorausgesetzt, Mikrokerne haben überhaupt eine längere Verweildauer in Erythrozyten - sogar daran gedacht werden, daß innerhalb von Tagen die Menge mikrokernhaltiger Erythrozyten im Knochenmark drastisch zunehmen könnte, was auch VICTOR (1978) in diesem Falle vermutet. Handfeste Beweise für solch ein Verhalten des Knochenmarks sind allerdings weder bei ihm, noch bei BOLLER und SCHMID (1970), MÜLLER u. Mitarb. (1972), VON LEDEBUR und SCHMID (1973) oder

bei WEBER u. Mitarb. (1975) zu finden, die jeweils etliche Zeitintervalle bis hin zu 16 Tagen nach der Applikation der Testsubstanz durchgetestet haben.

Die Beobachtung, daß Mikrokerne nicht in der Peripherie, sondern fast ausschließlich im Knochenmark auftreten, kann schließlich auch mit der mehr oder weniger starken gewebsschädigenden Wirkung der mutagenen Substanzen auf das Knochenmark erklärt werden, aufgrund derer nicht nur die Neubildungsrate granulopoetischer wie erythropoetischer Zellen stark herabgesetzt ist, sondern durch Zelluntergang auch freie Markhöhlen entstehen, die mit peripherem Blut aufgefüllt werden und - physikalisch betrachtet - zu einer starken Vermischung ortsansässiger Zellen mit peripheren Erythrozyten führen. Junge Knochenmark-Erythrozyten können daher in größerem Umfang nicht in die Peripherie gelangen, weswegen sich auch mikrokernhaltige Zellen nur vereinzelt dorthin verirren dürften.

Die technischen Einzelheiten von Präparateherstellung und Auswertung im Mikrokerntest sind im Kapitel IV ("Material und Methoden") dargestellt.

5. Literatur

Seit 1970 sind bereits mehr als zwanzig wissenschaftliche Arbeiten erschienen, in denen der Mikrokerntest entweder als brauchbare Alternative zur Chromosomenanalyse des Knochenmarks untersucht worden ist oder bereits als Routinemethode angewandt wurde. Die grundlegenden Arbeiten von SCHROEDER (1970), BOLLER und SCHMID (1970), VON LEDEBUR und SCHMID (1973), sowie SCHMID (1975 a und b), in denen die methodologischen Fortschritte des Tests sichtbar sind, wurden bereits oben zitiert.

Die folgende Aufstellung enthält in chronologischer Reihenfolge noch weitere, z.T. ebenfalls wichtige Arbeiten,

die in der Diskussion noch eingehend zu besprechen sind. Die jeweils getesteten Substanzen wurden hinzugefügt, um das Spektrum der jüngst mit dem Mikrokerntest untersuchten Substanzen - einschließlich Cyclophosphamid - sichtbar zu machen.

SCHROEDER (1970)	./.
BOLLER und SCHMID (1970)	Triaziquon (Trenimon)
MATTER und SCHMID (1971)	Triaziquon (Trenimon)
SCHMID (1972)	./.
MÜLLER, LANGAUER u. Mitarb. (1972)	Cyclophosphamid (Endoxan)
SCHMID (1973)	./.
VON LEDEBUR u. SCHMID (1973)	Triaziquon (Trenimon)
MILLER (1973)	Mitomycin-C, Colchicin (Colcemid)
HEDDLE (1973)	Bestrahlungen
MATTER u.GRAUWILLER (1974)	Triaziquon (Trenimon), Cyclophosphamid (Endoxan), Triäthylenmelamin (TEM), Methylmethansulfonat (MMS), Äthylmethansulfonat (EMS), Mitomycin-C, Colchicin, Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und Coffein
MATTER u. Mitarb. (1974)	./.
RICHARDSON (1974)	Tris-1-(2-Methylaziridinyl-)-phospinoxid (METEPA)
SCHMID (1975 a und b)	./.
WEBER u. Mitarb. (1975)	Trimethylphosphat (TMP) Triäthylenmelamin (TEM), Hycanthon und Niridazol
JENSSEN (1974)	Acranil und Quinacrin
GOETZ u. ŠRAM (1975)	Cyclophosphamid (Endoxan)
MÜLLER, FRITZ u.Mitarb. (1976)	Verschiedene fluoreszierende Weißmacher
WILD (1976)	Nitrosamine, Triazene, Ifosfamid u. Trofosfamid (Ixoten)

RUPPERT (1976)	Benzol
MATTER (1976)	Triaziquon (Trenimon), Ergotamintartrat, Hydergin und Deseril
SEILER (1976)	Methylbenzimidazolylcarbamat (MBC) und andere Benzimidazol-Derivate
BAUKNECHT u.Mitarb. (1977)	Triaziquon (Trenimon), Cyclophosphamid (Endoxan), Dimethylphenyltriazen (PDMT), Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), Dimethylnitrosamin (DMNA) und Diäthylnitrosamin (DENA)
VICTOR (1978)	Cyclophosphamid (Endoxan)

III. Cyclophosphamid

1. Medizinische Anwendung

Cyclophosphamid ist ein Pharmakon, das als Tumorhemmstoff und Immunsuppressivum in der Medizin breite Anwendung findet. Es wurde 1958 von ARNOLD und BOURSEAUX erstmals synthetisiert und in Deutschland unter dem Namen Endoxan auf den Arzneimittelmarkt gebracht. Die Substanz zählt zusammen mit Trofosfamid (Ixoten), Busulfan (Myleran), Chlorambucil (Leukeran), Melphalan (Alkeran), Thiotepa (Thiotepa Lederle) und Triaziquon (Trenimon) zu den Alkylantien, Stoffen, die Alkyl- (Methyl-, Äthyl, Propyl- oder Butyl-) gruppen auf organisches Material übertragen.

Cyclophosphamid wird als eines der potentesten Zytostatika angesehen, teilt aber dennoch - oder gerade deswegen - wesentliche Nachteile mit anderen Zytostatika. So kann auch Cyclophosphamid nicht in spezifischer Weise in den Tumorwechsel eingreifen bzw. nicht selektiv genug Fremdzellen,

die die physiologischen Funktionen des Wirtsorganismus beeinträchtigen, beseitigen. Es setzt wie andere Zytostatika nicht an der Qualität der falschen genetischen Information der Tumorzellen an, sondern nutzt lediglich die Quantität des Tumorwachstums aus. Durch seinen Wirkungsmechanismus erklärbar, reduziert es die körpereigene Abwehr und ist darüber hinaus teratogen, kanzerogen und mutagen, allerdings in jeweils unterschiedlicher Intensität. Die starke Mutagenität von Cyclophosphamid gab bei der Suche nach einer möglichst geeigneten Substanz für die vorliegende Arbeit den Ausschlag.

Cyclophosphamid hat ein breites Anwendungsspektrum: maligne Systemerkrankungen, wie Leukämien, Lymphogranulomatose, Lymphosarkom, Retikulosarkom, Plasmozytom und Morbus Waldenström sind Hauptindikationen. Es werden aber auch inoperable solide Tumoren , wie Mamma-, Bronchial- oder Ovarialkarzinome, Seminome, Neuroblastome oder das Ewing-Sarkom mit Cyclophosphamid behandelt. Darüber hinaus gilt es bei vitalen Indikationen im Verlauf von Immunkrankheiten (chronischen Arthropathien, systematischem Erythematodes, autoimmunhämolytischen Anämien oder nephrotischem Syndrom) als ultima ratio des Therapeuten. Häufig wird Cyclophosphamid mit anderen, nicht alkylierenden Zytostatika kombiniert, z.B. mit Antimetaboliten, Alkaloiden, Antibiotika, Enzymen oder Hormonen. Einige Behandlungsschemata haben sich hierfür als besonders geeignet erwiesen: das COAP-Schema, nach welchem Cyclophosphamid, Oncovin-, Ara-C und Prednisolon alternierend verabreicht werden, das MEPA-Schema, abgeleitet von Methotrexat, Endoxan, Mercaptopurin und Cytosin-Arabinosid, sowie die gängige Kombination von Cyclophosphamid, Vincristin und Dactinomycin. Die zuweilen sehr sinnvolle Kombination solcher medikamentösen Behandlung mit operativen oder aktinischen Eingriffen darf als bekannt vorausgesetzt werden. - Cyclophosphamid

wird außerhalb der Humanmedizin auch in der Veterinärmedizin und kommerziell zur Entvliesung von Schafen angewandt.

2. Pharmakokinetik und Pharmakologie

Das pharmakokinetische Verhalten von Cyclophosphamid speziell beim Chinesischen Hamster ist bislang noch nicht eingehend untersucht worden. Doch sind wesentliche Unterschiede zum Verhalten bei der Maus nicht zu erwarten. PANTAROTTO u. Mitarb. (1974) zeigten anhand quantitativer gaschromatographischer Bestimmungen an Serum, Urin und Leberhomogenaten der Maus, daß nach intravenöser Verabreichung der Substanz die Cyclophosphamidkonzentration in der Leber innerhalb 5 min doppelt so hoch war wie die Serumkonzentration. Da der Serumspiegel noch nach 2 Stunden nicht die in der Leber gemessenen Werte erreichte und außerdem im Urin nur 5 % des applizierten Cyclophosphamid in unveränderter Form wiedergefunden wurde, lag der Schluß nahe, daß beim Laboratoriumssäuger in ähnlicher Weise wie beim Menschen eine enzymatische Umwandlung der ursprünglichen Substanz in der Leber stattfinden muß.

Zum Verständnis der Pharmakologie der Substanz ist die Kenntnis einiger ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften erforderlich: die reaktive Gruppe der Substanz ist ein N-Lost mit zwei Chloräthylgruppen (Abb.1). Der systematische Name ist 2-Bis-(2-Chloräthyl)-amino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid. Es ist eine weiße Substanz von pulvriger Beschaffenheit, die erst kurz vor dem Gebrauch als Injektions- oder

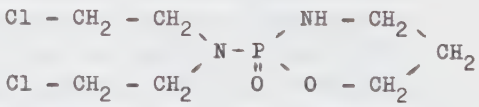
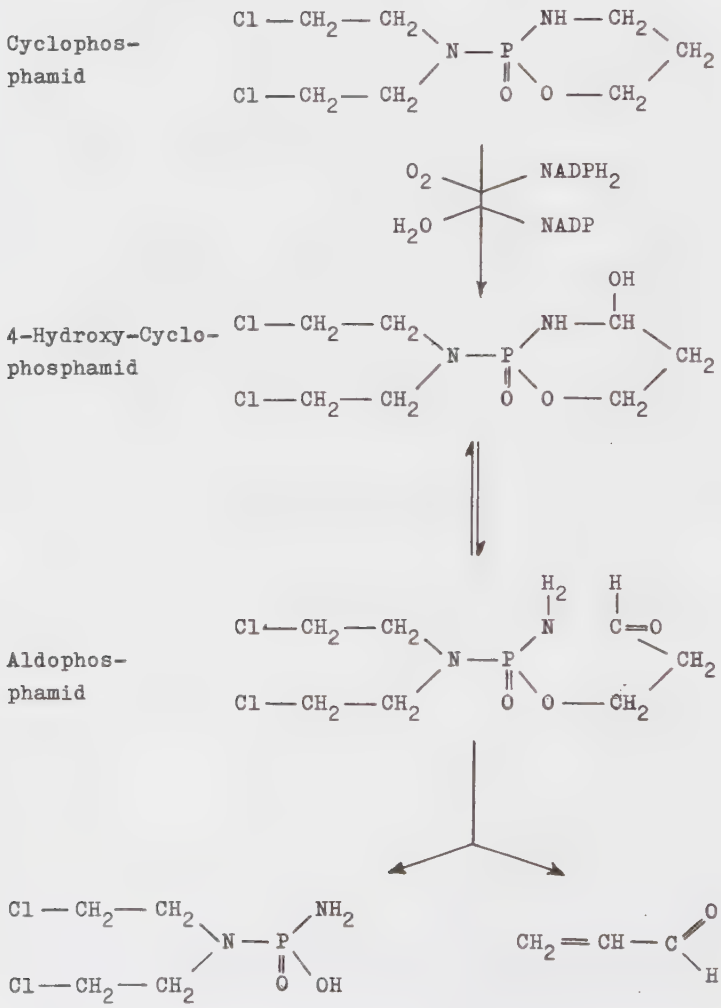


Abb. 1 Cyclophosphamid (Endoxan)

Infusionslösung in aqua pro injectione aufgelöst wird. Der pH-Wert einer 1 %igen wässrigen Lösung liegt bei 4,5. Eine Sättigung der Lösung tritt bei 4 %iger Konzentration ein. Das Molekulargewicht der Substanz, die als Hydrat (mit 1 mol H_2O) aus gut ausgebildeten Kristallen besteht, ist 261,08 und ihr Schmelzpunkt liegt bei 41 bis 45 Grad Celsius.

Cyclophosphamid ist in vitro unwirksam, was sehr gut an der äußerst langsamen Chloridionen-Freisetzung aus dem Chloräthylgruppen im NBP-Test (Messung der alkylierenden Aktivität) nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich wird die Substanz gemäß dem Transportform-Wirkform-Prinzip (BROCK und HOHORST, 1963) erst nach Passage durch die Leber in aktive Metabolite umgewandelt. Mischfunktionelle Oxidasen wandeln die Ausgangssubstanz im endoplasmatischen Retikulum der Leber bzw. in den Leber-Mikrosomen zunächst in 4-Hydroxy-Cyclophosphamid um (CONNORS u. Mitarb., 1974). Aus deren tautomerer Form Aldophosphamid entsteht dann durch Abspaltung von Acrolein der Phosphoramid-Lost mit der Formel N,N-Bis-(2-chloräthyl)-phosphordiamidsäure. Letztere Verbindung soll erst in der Zelle selbst entstehen und die eigentlich zytotoxische Substanz sein (Abb. 2).

Abb. 2 Metabolismus von Cyclophosphamid in der Leber bzw. in den Zellen (letzter Reaktionsschritt)



In Konkurrenz zu diesem Prozeß steht die enzymatische Umwandlung von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (durch Dehydrogenation) und Aldophosphamid (durch Oxidation) in die in vivo-Metabolite 4-Keto-Cyclophosphamid und Carboxyphosphamid, die nach CONNORS u. Mitarb. (1974) ebenfalls eine (allerdings geringe) Zytotoxizität besitzen. Weitere Metaboliten von niedriger Zytotoxizität sind: nach Abspaltung einer Chloräthylgruppe das 2-(2-chloräthyl)-amino-tetrahydro-2 H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und nach Ringspaltung das 3-Hydroxypropyl-N,N-Bis-(2-chloräthyl)-phosphorodiamidat.

Die Umwandlung von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid in Aldophosphamid und N,N-(2-chloräthyl)-phosphorsäurediamid (vgl. Abb. 2) kann laut VÖLKER u. Mitarb. (1974) wie folgt untergliedert werden:

1. Öffnung des Oxazaphosphorinringes unter Bildung von Aldophosphamid
2. Rückreaktion von Aldophosphamid zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (Gleichgewichtseinstellung)
3. Hydrolyse der P-O-Bindung des Aldophosphamids unter Abspaltung von Acrolein.

3. Toxikologische Befunde

Die zytotoxische Aktivität der Metabolite wird je nach Autor und Versuchsanordnung unterschiedlich beurteilt. CONNORS u. Mitarb. (1974) halten 4-Keto-Cyclophosphamid für eine Substanz mit geringer Zytotoxizität, was von anderen Autoren bestritten wird. Während VÖLKER u. Mitarb. (1974) den Phosphoramid- Lost als die eigentlich wirksame Substanz bezeichnen, sind ARLACON und MEIENHOFER (1971) der Ansicht, daß der reaktionsfähige Aldehyd Acrolein für

die tumorhemmende Wirkung entscheidend ist. Nach SLADEK (1973) dagegen hat Acrolein wiederum keine zytostatische Wirksamkeit. Daß species-abhängige Unterschiede ebenfalls ein heterogenes Bild der Zytotoxizität der einzelnen Metabolite ergeben, ist nicht verwunderlich.

Wenn bisher von zytotoxischer Aktivität die Rede war, so blieb der Feinmechanismus dieser Aktivität und das für Alkylantien kennzeichnende Geschehen am Wirkort noch unerwähnt. Schon früh glaubte man, den Angriffspunkt des Cyclophosphamids im DNS-Stoffwechsel lokalisieren zu müssen. 1963 schrieben PALME u. Mitarb., "daß, solange kein anderer Stoffwechselprozeß gefunden wird, der gegen Cyclophosphamid noch empfindlicher ist, die Hemmung der Biosynthese der DNS mit der therapeutischen Wirkung des Endoxan zusammenhängt". RATHGEN u. Mitarb. (1963) wiesen nach, daß die Störung des DNS-Stoffwechsels nicht durch eine Erhöhung der DNAse-Aktivität herbeigeführt wird. SCHNITGER und UEHLEKE fanden 1969, daß Cyclophosphamid nicht in das System der cytoplasmatischen Proteinsynthese eingreift. So blieb zunächst das Faktum einer DNS-Erniedrigung im Gewebe, das noch einmal von SCHMIDT 1970 konstatiert wurde, aber den eigentlichen Wirkungsmechanismus noch nicht erklärt.

Einige Veröffentlichungen sprechen dafür, daß die DNS-Synthese-Hemmung indirekt durch Änderung der Enzymkinetik bewirkt werde, wobei teilweise die Möglichkeit einer direkten Alkylierung der DNS ausgeschlossen und die Alkylierung z.B. von Enzymen angenommen wird. So fanden WHEELER und STEPHENS (1965) keinerlei qualitative Unterschiede zwischen der DNS behandelter und der DNS unbehandelter Tiere. Genaueres über die Änderung der Enzymkinetik veröffentlichten TOMISEK u. Mitarb. (1966). Bei der Beobachtung von Plasmozytomen registrierten sie in zeitlicher Reihenfolge (scil. nach Cyclophosphamidgabe):

a) eine Stimulierung des DNS-Synthetase-Systems,

b) vom 4. Tag an einen Wachstumsstillstand des Gewebes,

c) anschließend eine Abnahme der Aktivität des DNS-Synthetase-Systems und schließlich

d) eine Abnahme der Thymidin-5'-Phosphatkinase-Aktivität.

Zum gleichen Problem erschienen etliche andere Arbeiten. LISS u. Mitarb. (1966) wiesen eine Inaktivierung der DNS-Polymerase nach. HELGE u. Mitarb. (1966) fanden den Einbau des Uridintriphosphats (UTP) in die Mitochondrien-RNS beeinträchtigt, während der Einbau im Zellkern nur geringfügig gestört war. KLINKE u. Mitarb. (1966) erhielten nach Cyclophosphamidgabe nur einen Prozentsatz von weniger als 1 : 100.000 alkylierten Nucleotiden. WHEELER und ALEXANDER (1969) stießen auf eine primäre Abnahme der DNS-Nucleotidyltransferase, der erst sekundär die Abnahme der DNS- und RNS-Syntheserate folgte. HELGE u. Mitarb. (1968) kamen zu der Überzeugung, daß eine Matrizen-Funktionsstörung der DNS wohl nicht vorliegen könne, und LISS u. Mitarb. (1973) schlossen indirekt aus Tierexperimenten, daß eine Alkylierung der DNS nicht ursächlich für die zytostatische Wirkung in Frage käme. Sie erklären die Wirkung von Cyclophosphamid u.a. mit einer Hemmung der im Anschluß an die DNS-Synthese stattfindenden Umbauprozesse des Chromatins und - damit eng zusammenhängend - mit der Erzeugung eines prämitotischen Blocks.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten stehen neuere Arbeiten, die den primären Angriffspunkt der Endoxan-Metaboliten auch in einer unmittelbaren Alkylierung der DNS sehen. MURTHY u. Mitarb. (1973) bewiesen, daß die Metaboliten tatsächlich kovalente Bindungen mit Proteinen, RNS und DNS eingehen, wie es DRUCKREY bereits 1969 vermutet hatte. Proteine, RNS und DNS sollen dabei in unterschiedlichem Umfang alkyliert werden. In einem Elektrophorese-

Verfahren mit isolierten DNS-Proteinen fand WENZEL (1970) unterschiedliche Fraktionierungen vor und nach Cyclophosphamidgabe. Er vermutete, daß DNS-Bruchstücke, die bei enzymatischen Reparierprozessen an der DNS freigesetzt werden, ursächlich daran beteiligt waren. Die Entdeckung KUMMERs (1971), daß Alkylantien besonders bei solchen Tumoren wirksam sind, die einen beträchtlichen ^{14}C-Thymidin- und Desoxyuridin-Einbau in die DNS aufweisen, läßt ebenfalls auf eine direkte Alkylierung der DNS schließen. KÖHLER und MERKER (1973) wiederum halten eine Störung des Transskriptase-Mechanismus für die mögliche Primärwirkung der Endoxan-Metabolite. Auch ihre Auffassung läßt sich mit einer direkten Alkylierung der DNS vereinbaren.

Der direkte und systematisch durchgeführte Nachweis einer DNS-Alkylierung durch Cyclophosphamid ist Aufgabe einer molekularbiologisch orientierten Toxikologie, während es der Mutationsforschung schwer fallen dürfte, mehr als die mittelbaren, erst auf chromosomaler Ebene sichtbar werdenden Folgen in Form von Chromosomenaberrationen objektivierbar zu machen. Cyclophosphamid ist zwar in etlichen Testsystemen als mutagen erkannt worden, so u.a. in HeLa-Zellen (VRBA, 1967), menschlichen Leukozytenkulturen (NASJLETI und SPENCER, 1967), männlichen Keimzellen (SCHLEIERMACHER, 1966; BRITTINGER, 1966), in weiblichen Keimzellen (RÖHRBORN, 1970; HANSMANN, 1974), indirekt im Dominanten Letaltest (RÖHRBORN und VOGEL, 1967) und im modifizierten Host mediated Assay (SIEBERT, 1973), einen Beweis für die indirekte DNS-Alkylierung stellen diese Mutagenitätsuntersuchungen freilich nicht dar.

Wenn trotz einiger Gegensätze in den zitierten Arbeiten eine Aussage über die Wirkungsweise von Cyclophosphamid abschließend gewagt werden soll, so ist es am wahrscheinlichsten, daß der oben erwähnte Phosphoramid-Lost als aktivster

Metabolit innerhalb der Zellen die Fähigkeit besitzt, sowohl Proteine und RNS als auch DNS zu alkylieren. Die von allen Autoren gefundene Beeinträchtigung des DNS-Stoffwechsels bzw. der Transskriptions- und Replikationsvorgänge dürfte demnach mittelbar über die Alkylierung der RNS und Proteine (z.B. der Enzyme) wie auch unmittelbar über die direkte DNS-Alkylierung erfolgen.

4. Mutationsmechanismen

Im Rahmen der Mutagenese spielt die Alkylierung der DNS und ihrer Enzyme verständlicherweise die wichtigste Rolle. Man kann zwei primäre Mutationsmechanismen unterscheiden:
a) eine direkte Störung der Basenpaarung im Zuge der Replikation der DNS (= direct mispairing) und
b) eine - bezogen auf die DNS - indirekte Störung, welche an jenen Enzymen ansetzt, die für die Entfernung falsch eingebauter Nucleotiden, die Einsetzung neuer, passender Nucleotiden bzw. für die Selektion der Nucleosidtriphosphate verantwortlich sind (= misrepair mutagenesis). Beide Mechanismen führen zu weiteren Störungen im Bereich von Replikation, Transskription, Translokation, molekularem Aufbau der Proteine (und Enzyme) oder strukturellem Aufbau der Chromosomen, in deren Gefolge eine in Vielem noch unverstandene pathophysiologische Kausalkette erst in Gang gesetzt wird.

Der Mutationsmechanismus der misrepair mutagenesis (b), über welche in Kap. III.3 (im Zusammenhang mit Enzymalkylierungen) bereits einiges vorweggenommen wurde, kann seinerseits auf zweierlei Art und Weise ablaufen: entweder fällt die mutationsverhindernde Funktion eines oder mehrerer Enzyme (Endonukleasen, Exonukleasen, DNS-Nucleotidyltransferasen, DNS-Polymerasen oder DNS-Ligasen) aus oder diese Funktion läuft fehlerhaft ab (= error prone postreplication repair system), wie DRAKE und BALTZ (1976)

es für einen großen Teil der mutagenen Substanzen annehmen.

Im Falle des direct mispairing (a) paaren sich verschiedenartig veränderte Basen mit normalen oder ebenfalls veränderten Basen, wobei sogar auch Pyrimidin-Pyrimidin- und Purin-Purin-Paarungen gebildet werden können. DRAKE und BALTZ (1976) beschreiben über 20 solcher mispairing-Konstellationen, die sich im Falle des sog. loopout extra-, ansonsten intrahelikal in die DNS einfügen (je nach räumlicher Zuordnung zueinander) und zum Teil nicht durch Wasserstoffbrücken, sondern durch bestimmte Winkel oder Entfernungen stabilisiert werden. Von den Veränderungen seien Verschiebungen der sterischen Anordnung der Basenpaare zueinander, Ionisierungen und vor allem Alkylierungen genannt, von denen letztere bei weitem die größte Rolle spielen.

Alkylierungen kommen im Rahmen monomolekularer SN_1- bzw. bimolekularer SN_2-Reaktionen zustande, in denen nucleophile Substitutionen die Anbindung der Alkylgruppen vermitteln. Es können, abhängig von der alkylierenden Substanz, nahezu alle dafür empfänglichen Positionen der normalen Basen alkyliert werden, so zum Beispiel die Position
N1, N^2, N3, O^6, N7 und C8 des Guanin,

N1, N3, N^6, N7 und C8 des Adenin
N3 und N^4 des Cytosin sowie
N3 und O^4 des Thymin.
Daneben werden auch Phosphattriester durch Alkylierung gebildet. - Nicht alle Alkylierungsbeispiele führen zu Mutationen. So soll das häufig, u.a. auch von WEICKER (1973) zitierte N7-Alkyl-Guanin - nach DRAKE und BALTZ unter den meisten Bedingungen das häufigste Alkylierungsprodukt überhaupt - per se nicht zu manifesten Mutationsfolgen führen. Unter den (hier unterstrichenen) Alkylierungsprodukten, die diese Folgen tatsächlich hervorrufen können, zeichnen sich in erster Linie das O^6-Alkyl-Guanin und das O^4-Alkyl-Thymin aus (Abb. 3), die zu einer

unmittelbaren Störung der Basenpaarung ausgesprochenermaßen fähig und mit der Mutagenese hoch korreliert sind.

Die Frage, ob bei der Entstehung dieser Alkylierungsprodukte monofunktionelle Alkylantien (mit einer reaktiven Gruppe) oder polyfunktionelle (mit zwei oder mehr Alkylgruppen) beteiligt sind, hat insofern Bedeutung, als im ersten Fall Einzelalkylierungen, evtl. mit der Folge eines Kettenabbruches der DNS und Chromosomenbrüchen, eintreten, im zweiten Fall aber zusätzlich auch Guaninvernetzungen zwischen verschiedenen DNS-Strängen, evtl. mit der Folge chromosomaler Exchange-Figuren, beobachtet werden können (Abb. 4).

Das weitere Schicksal der genannten Alkylierungsprodukte einschließlich O^6-Alkyl-Guanin und O^4-Alkyl-Thymin ist unterschiedlich und von unterschiedlicher Bedeutung (vgl. RÖHRBORN, 1970 a): es kann eine Depurinierung eintreten, die aber meistens mit Hilfe des komplementären DNS-Stranges schnell rückgängig gemacht werden kann (Abb.5). Es kann andererseits eine falsche Base als Ersatz eingebaut werden und eine Punktmutation entstehen (Abb. 6). Im Falle einer erhöhten Azidität im umgebenden Milieu kann sich Alkyl-Guanin fälschlicherweise mit Thymin paaren und dadurch eine Transition von C - G nach A - T verursachen (Abb. 7). Wie RÖHRBORN (1960) erstmals darstellte, ergibt die Alkylierung der freien Hydroxylgruppe am Phosphorsäurediester der Zucker-Phosphat-Kette einen unstabilen Phosphorsäuretriester. Dieser kann sich durch Alkylabspaltung wieder stabilisieren (vgl. DRAKE und BALTZ, 1976). Möglicherweise aber alkyliert er seinerseits eine Base durch Transalkylierung auf N7 (Abb. 8) oder er behält die Alkylgruppe, verursacht aber dadurch eine Diskontinuität der DNS, daß er die Phosphoribosylkette unterbricht. Letzteres käme einer "Prämutation" gleich, die bei entspiralisierter DNS und Unmöglichkeit einer Restitution durch den Komplementärstrang zur Mutation werden könnte.

Abb.3a O^6-Alkyl-Guanin

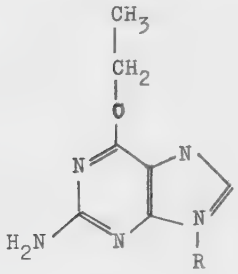


Abb.3b O^4-Alkyl-Thymin

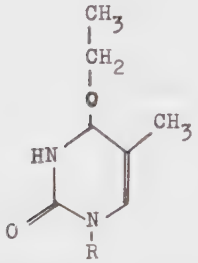


Abb.4 N7-Guanin-Vernetzung zwischen zwei DNS-Strängen am Beispiel des Phosphoramid-Losts (modifiziert nach WELLHÖRNER,1975)

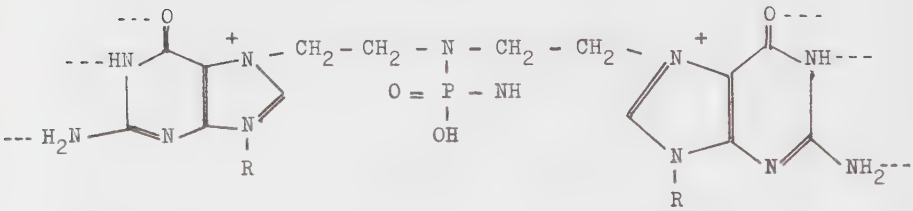


Abb.5 Basenverlust (Guanin) und restitutio ad integrum durch den komplementären DNS-Strang

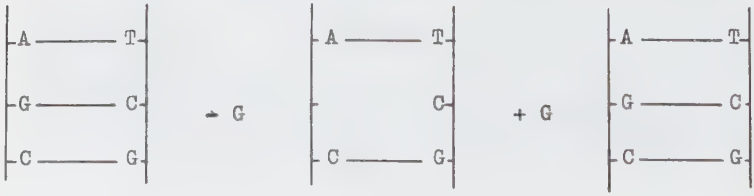


Abb.6 Einbau einer falschen Base. -G = Basenverlust von Guanin. +T = Einbau von Thymin. Nach dem dritten Pfeil: Zustand nach Replikation.

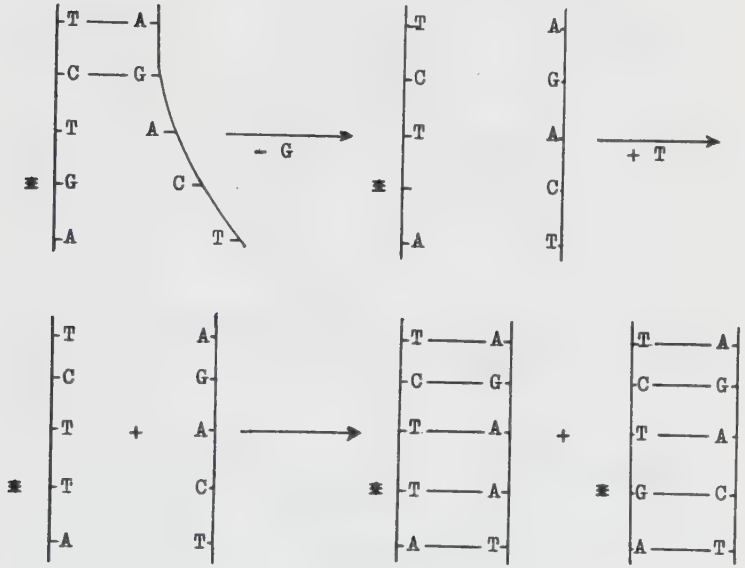


Abb.7 Transition

Abb.8 Transalkylierung

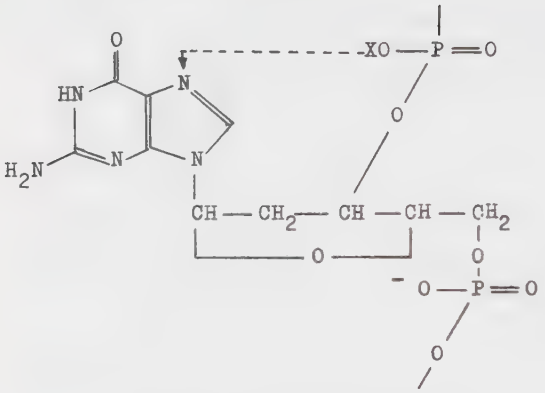


Abb.9 Unterbrechung der Phosphoribosylgruppe

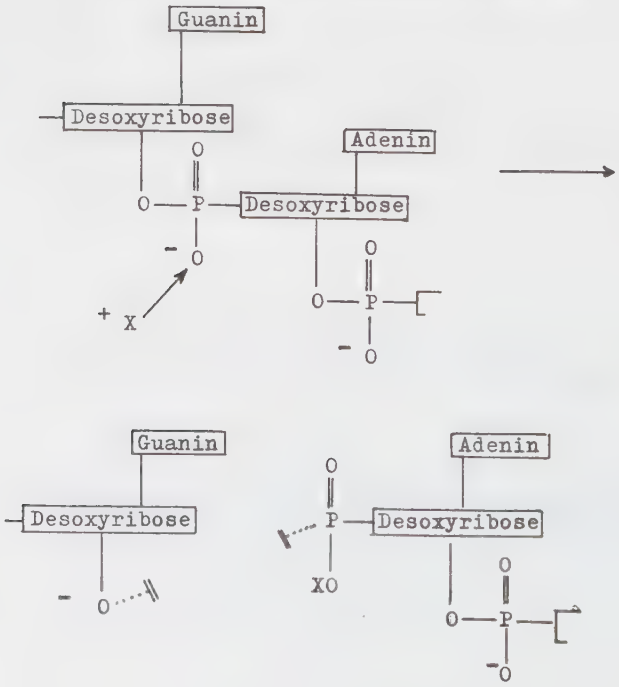
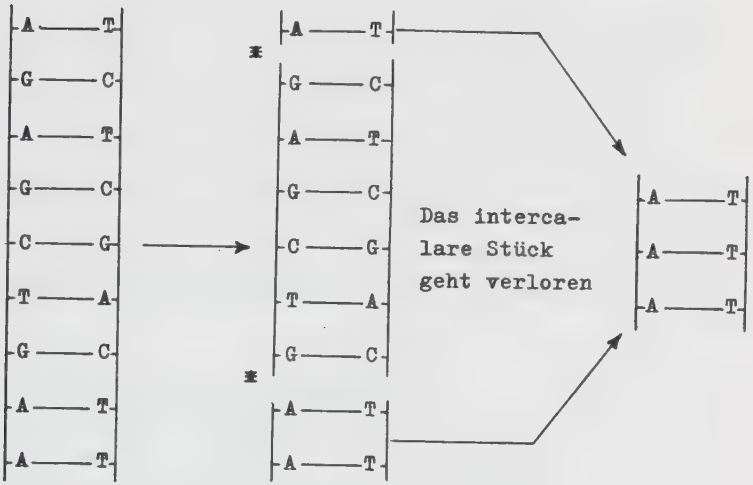


Abb.10 Zweimalige Unterbrechung der Phosphoribosylkette → Intercalare Deletion mit Verlust von 6 Basenpaaren



IV. Material und Methoden

1. Tiere

Als Versuchstier für die eigenen Untersuchungen diente der Chinesische Hamster (Cricetulus griseus) aus der Zucht des Instituts für Anthropologie und Humangenetik in Heidelberg. Die Tiere waren 12 - 15 Wochen alt. Das Geschlechtsverhältnis war 1:1 und das Gewicht der Tiere betrug durchschnittlich 30 g $\pm$ 1,5 g. Die Tiere wurden von 6 bis 18 Uhr im Hellen, den Rest des Tages im Dunkeln belassen und einer Temperatur von 22 $\pm$ 1 Grad Celsius und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 - 70 % ausgesetzt. Die Nahrung bestand aus Hamster-Preßfutter und Leitungswasser ad libitum.

2. Testsubstanz und Applikation

Die Testsubstanz, Cyclophosphamid, wurde den Tieren zweimal im Abstand von 24 Stunden intraperitoneal injiziert, wobei die Injektionsmenge konstant 1 ml betrug. Als Dosierung wurden 13,3 mg, 40 mg und 120 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht gewählt. Diese Dosen entsprechen genau 1/30, 3/30 = 1/10 und 9/30 = 3/10 der LD_{50} von Cyclophosphamid, die beim Chinesischen Hamster mit 400 mg der Substanz anzusetzen ist (vgl. HERWIG, 1973). Um auch die zeitliche Abhängigkeit der Aberrationsraten - bezogen auf die Zeitspanne zwischen Applikation der Substanz und Aufarbeitung der Tiere - beurteilen zu können, wurden in Anlehnung an HERWIG (1973), STEGNER (1974) u.a. Autoren zwei verschiedene Aufarbeitungsintervalle gewählt. Diese Intervalle betrugen, von der letzten Cyclophosphamidgabe an gerechnet, 12 bzw. 24 Stunden und waren insofern der Wirkdauer der Substanz im Organismus angemessen gewählt. Jeweils 2 Stunden vor der Aufarbeitung der Tiere wurde 3,3 mg/kg Körpergewicht N-Deacetyl-N-Methyl-Colchicin (Colcemid, Abb. 11) injiziert, um für die Chromosomenanalyse die Mitosetätigkeit der Zellen zum Zeitpunkt der Metaphase zu unterbrechen.

Die zeitlichen Verhältnisse des Versuchs sind in Abb. 12 dargestellt.

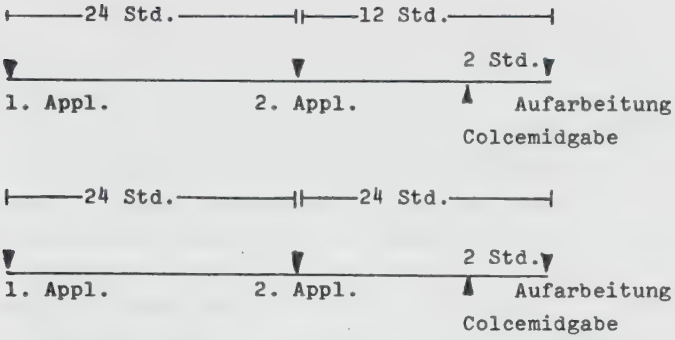


Abb. 12 Zeitliche Versuchsanordnung

Obwohl in vielen ähnlich angelegten Versuchen die Kontrollraten gleichbleibend gering waren, wurde eine Gruppe von Tieren ohne Cyclophosphamidbehandlung als Negativkontrolle mit untersucht. Es entstanden somit sieben Behandlungsgruppen :

1. Kontrolle
2. 13,3 mg/kg, 12 Std.
3. 40 mg/kg, 12 Std.
4. 120 mg/kg, 12 Std.
5. 13,3 mg/kg, 24 Std.
6. 40 mg/kg, 24 Std.
7. 120 mg/kg, 24 Std.

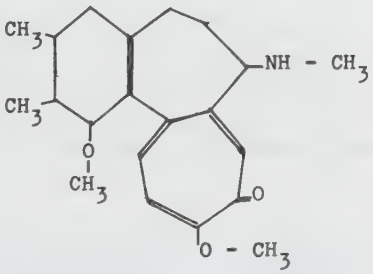


Abb. 11
N-Deacetyl-N-Methyl-Colchicin
(Colcemid)

Pro Gruppe wurden 10 Tiere (in der Kontrolle 12) behandelt und aufgearbeitet, was einer Gesamtzahl von 72 Tieren entspricht. Aus jeder Gruppe gelangten jedoch nur die Präparate von 5 Tieren zur Auswertung (Kontrolle 6), so daß der vorliegenden Arbeit die Daten von insgesamt 36 Tieren zugrundegelegt werden konnten. Alle Präparate wurde zur Auswertung codiert und erst nach Erfassung aller Daten den Behandlungsgruppen zugeordnet. Sie wurden bei 160- bzw. 1000-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet.

Die vom Ad Hoc-Kommitee der "Environmental Mutagen Society" 1972 (vgl. NICHOLS u. Mitarb., 1972) vorgeschlagene Anzahl von 50 Metaphasen, die pro Tier in der Chromosomenanalyse auszuwerten sind, wurde in der Annahme verdoppelt, daß mit 100 ausgewerteten Metaphasen pro Tier eine statistische Sicherung und eine Annäherung an die großen Zahlen im Mikrokerntest (s.u.) eher möglich sei. Die Zahl ausgewerteter Erythrozyten im Mikrokerntest belief sich auf 2000 pro Tier, was in Anlehnung an SCHMID (1972) als Minimum angesehen werden muß.

3. Materialien

Colchicinlösung:
1 mg Colcemid-Reinsubstanz (Mel. 1-6/57; CIBA-Geigy) = N-Deacetyl-N-Methyl-Colchicin auf 500 ml 0,9%ige Kochsalzlösung. Dies entspricht einer 0,2%igen Colcemidlösung. Die Lösung soll mindestens 1 Tag vor der Applikation fertiggestellt sein.

Silikonisierung:
Alle mit dem Knochenmark in Berührung kommenden Glaswaren wurden silikonisiert.
-Siliclad (Clay Adams, Division of Becton, Dickinson Nr. 1950) mit Aqua dest. 1:100 verdünnen
- 5 Sekunden die Glaswaren einlegen
- mit Aqua dest. nachspülen
- 10 min. bei ca. 77 Grad Celsius im Trockenschrank trocknen oder 24 Std. bei Zimmertemperatur

GIEMSA-Lösung

Die GIEMSA-Stammlösung (Merck Art. 9204) enthält Azur II und eosinsaures Azur II in Methanol-Glycerin (1:1). In der (mit Aqua dest. hergestellten) GIEMSA-Gebrauchslösung fallen durch die Farbstoffübersättigung metallisch glänzende Farbstoffe aus, was zu dichten Farbniederschlägen im Präparat führen kann. Die Farblösungen sind deshalb vor Gebrauch zu filtrieren. Für den resultierenden Farbton gilt folgendes: die Färbung wird rotstichig, wenn das benutzte Wasser sauer statt neutral reagiert oder wenn die Raumluft Salzsäuredämpfe (z.B.aus HCL-Alkohol) enthält. Die Färbung wird blaustichig, wenn alkalisch reagierendes Aqua dest. verwandt wird. Zur Behebung dieser Störungen muß das für die Lösung verwandte Aqua dest. mit (Phosphat-) Puffer auf einen pH-Wert von 7 bis 7,2 eingestellt werden.

Herstellung der Gebrauchslösung:

- gebrauchsfertigen Puffer mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, anschließend das zugehaltene Gefäß kräftig schütteln
- 200 ml des (gepufferten) Aqua dest. zusammen mit 10 ml der GIEMSA-Stammlösung in ein Gefäß geben (1 Volumenteil auf 20 Volumenteile = ca 4,8 %ige GIEMSA-Gebrauchslösung)
- den Inhalt des Gefäßes durch ein Papierfilter in eine Färbeküvette gießen; den Filtriervorgang wiederholen, wenn an der Oberfläche immer noch Farbstoffe ausfallen
- die Lösung innerhalb der ersten halben Stunde nach Herstellung verwenden.

Fetales Kälberserum
Fetal Calf Serum, Difco Laboratories, Detroit,Michigan, USA

MAY-GRÜNWALD-Lösung (Merck, Art. 1424) enthält eosinsaures Methylenblau in Methanol-Glycerin (2:1); gebrauchsfertig nach Filtrierung.

4. Chromosomenanalyse des Knochenmarks

a) Herstellung der Präparate

Die für die Chromosomenanalyse des Knochenmarks bestimmten Präparate wurden nach der Methode von SCHMID und STAIGER (1969) hergestellt:

- 2 Stunden vor der Präparation wird 0,033 mg/10 g Körpergewicht Colchicin intraperitoneal verabreicht.
- Am in Äther getöteten Tier werden die beiden Oberschenkelknochen herauspräpariert und mit KLEENEX von allen Weichteilen befreit. Mit der Schere werden die beiden Epiphysen so kurz wie möglich abgeschnitten.
- Mit Spritze und Nadel (2 ml-Spritzen und 12er oder 16er Kanülen) wird das Knochenmark mit 37° C warmer HANK's Lösung in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen ausgespült. Mit einer Pasteur-Pipette gut aufpipettieren. 5 Min. bei 1200 UpM zentrifugieren.
- Hypotone Behandlung: Überstand abpipettieren. Suspendieren in 0,6 ml frischer HANK's Lösung (entweder graduierte Röhrchen verwenden oder mit Spritze arbeiten). Unter ständigem Pipettieren 1,8 ml eiskaltes Aqua dest. (10 ml Aqua dest.-Ampullen) zugeben. 15 Min. in ein Gefäß mit Eiswürfeln stellen und alle 4 bis 5 Min. durchpipettieren. 5 Min. bei 1000 UpM zentrifugieren.
- Fixieren: Überstand bis auf einen Tropfen absaugen, dann Sediment gut aufklopfen. 1 Tropfen frisches Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) zugeben, aufklopfen. Tropfenweise unter ständigem Aufklopfen ca 2 ml Fixativ langsam zugeben. 10 Min. mit Stopfen stehen lassen. 5 Min. bei 1000 UpM zentrifugieren. Dann den gleichen Fixiervorgang wiederholen. Danach wird das Röhrchen für mindestens 30 Min. im Kühlschrank aufbewahrt, besser ist über Nacht.

- Herstellen der Präparate: Noch einmal bei 1000 UpM zentrifugieren. Überstand bis auf 1 Tropfen absaugen. Mit frisch zubereitetem Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) eine Suspension herstellen, die milchig durchscheinend aussehen soll. Zur Präparateherstellung Objektträger vor der Aufarbeitung in einer Küvette mit Aqua dest. im Kühlschrank kühlen. Auf einen kalten, mit Aqua dest. gleichmäßig benetzten Objektträger 3 bis 4 Tropfen der Suspension auftropfen, gleichmäßig verblasen, sofort durch eine heiße Flamme ziehen, lufttrocknen lassen.
- Die trockenen Präparate mit GIEMSA-Gebrauchslösung 10 Min. färben, zweimal mit Aqua dest. spülen, lufttrocknen lassen, dann mindestens für 1 Std. in Xylol, bevor man sie mit EUKITT eindeckt (sofort eindeckeln).

b) Auswertungskriterien

Der Chromosomenanalyse des Knochenmarks wurden folgende Auswertungskriterien zugrunde gelegt:

Numerische Aberrationen

Vor der Registrierung einzelner Aberrationen wird die Vollständigkeit des diploiden Chromosomensatzes (beim Chinesischen Hamster 2n = 22) festgestellt und alle Chromosomen soweit identifiziert, daß die Gruppenzugehörigkeit zu den großen metazentrischen (4), mittleren metazentrischen (4), X/Y-Chromosomen (2), akrozentrischen (6) bzw. kleinen metazentrischen Chromosomen (6) sicher erscheint. Fehlende oder überschüssige Chromosomen führen zur Einstufung der Metaphase als aneuploid und werden identifiziert. Zur Unterscheidung zwischen Polyploidien und zufälligen Überlagerungen von Metaphasen wird bei tetra- oder oktoploiden Metaphasen vorausgesetzt, daß ein einheitlicher Spiralisierungsgrad aller Chromosomen vorliegt und die Metaphasenplatte eine räumliche

Einheit und Abgeschlossenheit aufweist. Da Aneuploidien wohl häufiger als Präparationsartefakte, denn als Hinweise auf mutagene Schädigung anzusehen sind, und die (seltener vorkommenden) Polyploidien nur zum Teil Mutationsäquivalente darstellen dürften, gehen numerische Aberrationen nicht in die Aberrationsquoten mit ein.

Pulverisationen

Metaphasen, die bis zur Unkenntlichkeit einzelner Chromosomen in kleine und kleinste Bruchstücke wie pulverig aufgerieben erscheinen und keinerlei Rückschlüsse auf den ursprünglichen Karyotyp mehr zulassen, werden als Pulverisationen eingestuft. Eine Untersuchung multipler Fragmentierungen von Pulverisationen ist eher von theoretischem Interesse und wird nicht vorgenommen. Zellen mit einer solchen Zerstörung des Genoms können ohnehin keine Mitose mehr durchlaufen. Sie fallen der Zellselektion anheim und sind nicht imstande, irgendwelche Mutationen an Tochterzellen weiterzugeben. Die Ursache einer Pulverisation kann im Einzelfall nicht eindeutig bestimmt werden. Virusinfektionen, die teils zu den unspezifischen Aberrationen, teils zu vorzeitigen Chromosomenkondensationen führen, ergeben (wie auch DNS-Synthesestörungen) ein täuschend ähnliches Bild. Da sich in Mutationsexperimenten herausgestellt hat, daß Pulverisationen eine schwach positive Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen lassen (u.a. BOLLER und SCHMID, 1970; MÜLLER, LANGAUER u. Mitarb., 1972) und insofern wenigstens zum Teil auch Mutationsäquivalente darstellen, werden sie - getrennt von den anderen Aberrationstypen - mit ins Auswertungsschema übernommen.

Gaps

Gaps stellen lichtmikroskopisch eine Unterbrechung der Chromatide dar, weswegen sie auch als achromatische

Läsionen bezeichnet werden. SCHEID und TRAUT (1970, 1971) zeigten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß eine tatsächliche Diskontinuität der DNS nicht vorliegt. Letzte Klarheit bezüglich ihrer Einordnung als Mutationsäquivalente ist trotz zahlreicher Veröffentlichungen (GEBHART, 1971; SCHEID und TRAUT,1970 und 1971; RIEGER u. Mitarb. 1976; u.a.) noch nicht erreicht. Ihre Einordnung ins Auswertungsschema wird zusätzlich dadurch erschwert, daß Prometaphase- bzw. nicht genügend spiralisierte Metaphasechromosomen, Heterochromatinbereiche (beim Chinesischen Hamster besonders an den distalen Enden der großen metazentrischen Chromosomen) und die Sekundärkonstriktionen der X-Chromosomen Gaps vortäuschen können.

Brüche und Fragmente

Chromosomenbrüche können morphologisch oft nur schwer von Gaps unterschieden werden. Während die Länge der scheinbaren Diskontinuität beim Gap die Breite der betroffenen Chromatide nicht wesentlich überschreiten und deutliche Achsenverschiebungen nicht erkennbar sein sollten, ist der Bruch daran zu erkennen, daß ein echtes Bruchstück mit deutlicher Dislokation vorliegt und die Gesamtstrecke des intakten Schwesterchromatidarms als Maß herangezogen werden kann für die Summe der Teilstrecken des gebrochen Arms. Beim Gap dagegen ist diese Summe kleiner als das Ausmaß des intakten Schwesterchromatidarms. Von Fall zu Fall lagert sich das Bruchstück in beliebiger Stellung wieder an homologe Teilstrecken des Schwesterchromatids an; immer aber gibt es eine räumliche Beziehung zwischen dem betreffenden Chromosom und seinem Bruchstück: es ist offensichtlich, daß beide zueinander gehörten.

Tauchen in einer Metaphase Bruchstücke auf, die offensichtlich keinem der umliegenden Chromosomen zuzuordnen

sind, so handelt es sich um Fragmente. Sie stammen aus einer der letzten Mitosen und können ihrerseits in einer der nachfolgenden Mitosen ganz eliminiert werden, womit im Normalfall ihre Fähigkeit, die Genbalance im Zellkern zu stören, nur auf einige wenige Zellzyklen beschränkt ist.

Die Prognose der Brüche ist in ca. 90 - 99 % der Fälle als günstig einzustufen (LEA, 1946, WOLFF, 1961; beide zitiert von RIEGER und MICHAELIS, 1967; SOBELS, 1973), da die Bruchenden meist in der ursprünglichen Ordnung wieder vereinigt werden (Restitution). Brüche können nach der Bruch-Reunions-Hypothese aber auch zu strukturellen Chromosomenmutationen führen, indem die Bruchenden andere als der ursprünglichen Ordnung entsprechende Verbindungen eingehen (Reunion). Sie können darüber hinaus einzelne Chromatiden, aber auch homologe Stellen zweier Schwesterchromatiden betreffen. Im letzteren Fall werden sie Isochromatidbrüche genannt und führen zu terminalen Deletionen (s.u.).

Brüche und Fragmente bilden, da sie nicht zu den manifesten strukturellen Chromosomenmutationen zählen, eine eigene Aberrationsklasse, die hinsichtlich ihrer Wertigkeit zwischen den Gaps und den Exchanges einzuordnen ist.

Exchanges

Die Aberrationsklasse mit den schwerwiegendsten mutagenen Veränderungen besteht aus Deletionen und Exchange-Figuren unterschiedlichster Art. Gemeinsame Merkmale sind die fast völlige Irreversibilität und die relativ hohe Stabilität, die zu Markerchromosomen und Zellklonen führen und quoad vitam zuweilen verheerend wirken können. Die in somatischen Zellen ablaufenden Aberrationen dieser Klasse dürften unabhängig von ihrer Entstehungsart zumindest bei einem Teil der Krebserkrankungen das erste morphologisch faßbare Substrat sein, an dem die pathophysiologische

Kausalkette der Krankheit ihren Anfang nimmt. Das Vorliegen von Zellklonen mit ein- und demselben Aberrationstyp, das hin und wieder bei Krebserkrankungen beobachtet werden kann, mag als Beweis dafür angeführt werden (RÖHRBORN, 1973).

Als Deletionen werden binnenständige, interkalare, als Defizienzen endständige, terminale, Chromosomenstückverluste bezeichnet, wobei das fehlende Chromatidmaterial sich irgendwo im Cytoplasma der betreffenden Zelle oder in der Zwillingstochterzelle und damit nicht in der untersuchten Metaphase befindet. Eine Unterscheidung von Deletionen und Defizienzen ist ohne Chromosomen-Banding nicht systematisch durchführbar und entfällt damit für die normale Chromosomenanalyse. Deletionen können - wie alle anderen Aberrationen auch - nur eine oder beide Schwesterchromatiden betreffen. Sind beide Arme betroffen, wird die Bedeutung einer gewissenhaften Identifizierung der einzelnen Chromosomen zu Beginn einer jeden Metaphasen-Auswertung verständlich: metazentrische Chromosomen mit endständigen Deletionen vom Chromosomentyp könnten leicht als normale akrozentrische Chromosomen fehlinterpretiert werden.

Exchange-Figuren im engeren Sinne, d.h. strukturelle Chromosomenmutationen ohne Deletionen, entstehen auf der Basis der oben erwähnten Reunionsvorgänge, was auch Grundlage der Bruch-Reunions-Hypothese von SAX und LEA ist (SAX, 1941; LEA, 1946). Die Gruppe dieser Exchange-Figuren ist ziemlich heterogen, weshalb mehrere verschiedene Einteilungsprinzipien vorgeschlagen wurden. Hauptsächlich kann man intrachromosomale Veränderungen, auch Intrachanges genannt, von interchromosomalen Veränderungen, die man als Interchanges zusammenfaßt, unterscheiden. Von eher theoretischem Interesse für die Zwecke der Routinetestung chemischer Mutagene ist die Unterscheidung von z.B. perizentrischen Inversionen und Ringchromosomen, die beide lichtmikroskopisch erfaßbar sind und zu den Intrachanges

zählen, und von dizentrischen Chromosomen sowie Translokationen, die in den vielfältigsten Ausprägungen vorkommen. Eine gute und systematische Übersicht über alle Typen geben sowohl RIEGER und MICHAELIS (1967) als auch SAVAGE (1975).

Klassifizierung

Die Klassifizierung der bisher vorgestellten Aberrationstypen (Gaps, Pulverisationen, Brüche und Fragmente, Deletionen und Exchanges) in der vorliegenden Arbeit sieht folgendermaßen aus:

1. Für die Zuordnung einer Metaphase zu einer Aberrationsklasse ist allein die jeweils schwerwiegendste Aberration maßgebend, die in dieser Metaphase gefunden werden kann (Exchanges ⟹ Brüche ⟹ Gaps). Eine Metaphase mit 3 Gaps und 1 Bruch wird dementsprechend der Bruchklasse (s.u., 4.) subsumiert und nicht zu den Gaps (3.) gezählt, eine Metaphase mit 2 Interchanges und 3 Brüchen in die Exchange-Klasse (5.) eingeordnet usw.
2. Pulverisationen werden wegen der fehlenden Eindeutigkeit ihrer Genese als eigene Aberrationsklasse abgesondert.
3. Auch Gaps werden als eigene Aberrationsklasse geführt, da ihre Bedeutung als Mutationsäquivalente im Vergleich zu den anderen Aberrationstypen geringer ist.
4. Brüche und Fragmente bilden unter der Rubrik "Brüche" eine Aberrationsklasse, die durch das Auftreten von Bruchereignissen, aber das Fehlen jeglicher Reunionsfiguren gekennzeichnet ist.
5. Deletionen und Exchange-Figuren im engeren Sinne (Intra- und Interchanges) werden unter der Rubrik "Exchanges" geführt und bilden gemeinsam eine

Aberrationsklasse, die die schwerwiegendsten mutagenen Veränderungen zusammenfaßt.

6. Die zur Aufstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven nötigen Gesamtaberrationszahlen werden aufgeteilt in:
   a) aberrante Metaphasen exclusive Gaps, zu denen alle Metaphasen mit Pulverisationen, Bruchereignissen und Reunionsfiguren zählen, und
   b) aberrante Metaphasen inclusive Gaps, zu denen alle Metaphasen mit mutagenen Veränderungen - gleich welcher Art - zählen.

7. Numerische Abweichungen der Chromosomenzahl werden nur gesondert registriert.

8. Eine Trennung zwischen Chromatidtypaberrationen (CTTA) und Chromosomentypaberrationen (CSTA) ist bei einer Versuchsanordnung wie in der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll, da die Aufarbeitungsintervalle länger sind, als daß G_2-Phase-Schädigungen noch mitotisch erfaßt werden könnten.

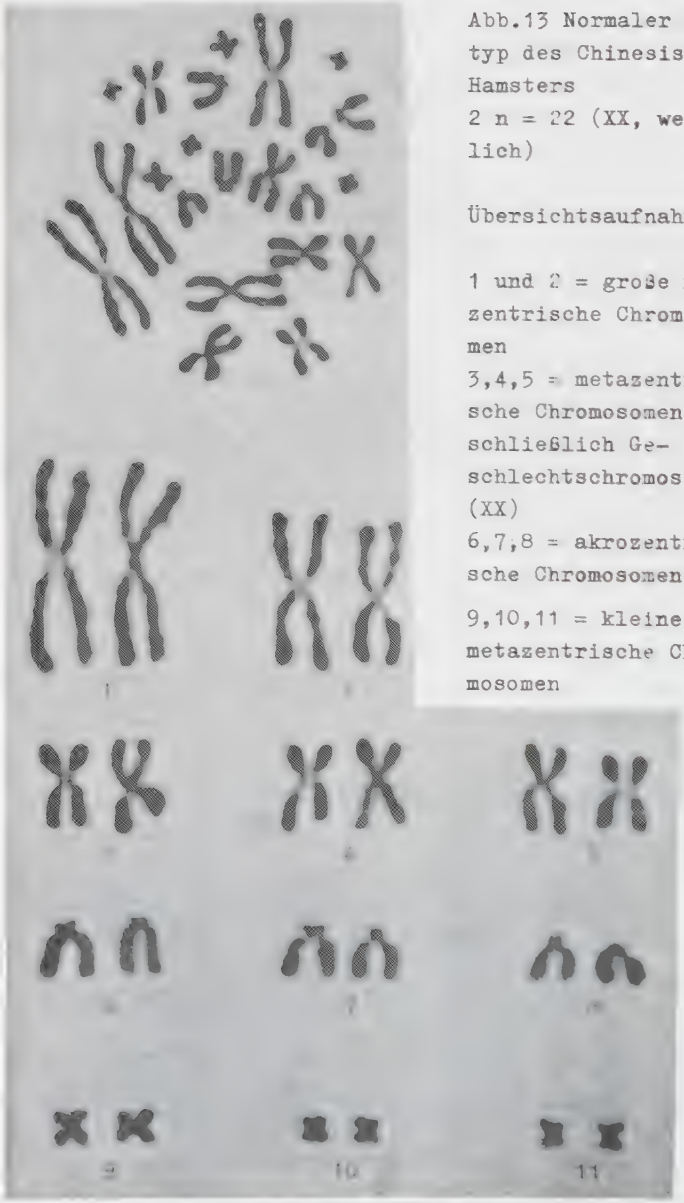


Abb.13 Normaler Karyotyp des Chinesischen Hamsters
2 n = 22 (XX, weiblich)

Übersichtsaufnahme

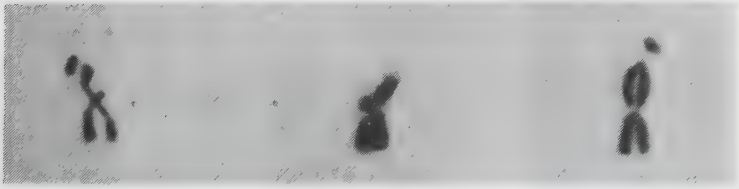
1 und 2 = große metazentrische Chromosomen
3,4,5 = metazentrische Chromosomen einschließlich Geschlechtschromosomen (XX)
6,7,8 = akrozentrische Chromosomen
9,10,11 = kleine metazentrische Chromosomen

(Abb.13) Typen chromosomaler Aberrationen

Ausschnitt aus einer pulverisierten Metaphase

Sekundärkonstriktionen des X-Chromosoms, keine Gaps

Gap



Bruch

Deletion

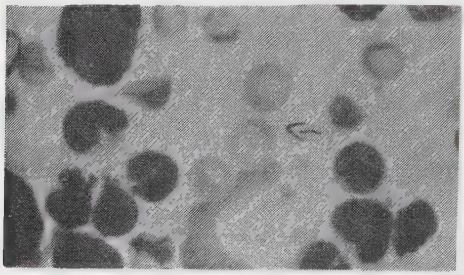
Aus einem Isochromatidbruch entstandene endständige Deletion mit Intrachangebildung und Doppelfragment

Exchange in Form einer Intrachangefigur (Ringbildung)

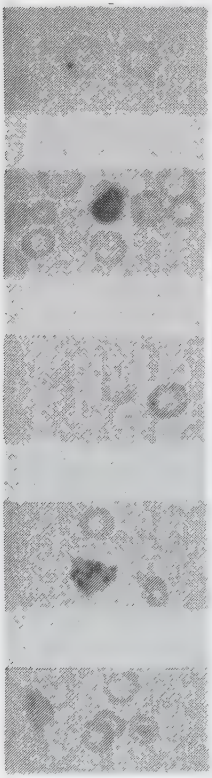
Exchange in Form einer Interchangefigur zweier Chromosomen

Exchange in Form einer Interchangefigur aus mehreren Chromosomen, zusätzlich Fragmente

Abb. 14 Mikrokerne und mikrokernähnliche Gebilde



Übersichtsaufnahme eines Knochenmarkausstrichs mit serienmäßig angeordneten Mikrokernen in einem jungen normochromatischen Erythrozyten



Mikrokern in einem jungen normochromatischen Erythrozyten. Durchmesser ca. $^{1}/_{10}$ des Zelldurchmessers

Polychromatischer Erythrozyt mit kleinem Mikrokern (Ø ca. $^{1}/_{15}$)

Polychromatischer Erythrozyt mit ausgefällter Substantia granulofilamentosa = Retikulozyt. Keine Mikrokerne

Karyorhexisgebilde in nekrobiotischer Zelle

Links: nicht auswertbarer polychromatischer Erythrozyt. Rechts: normochromatischer Erythrozyt mit Membranfaltung. Kein Mikrokern

5. Mikrokerntest

a) Herstellung der Präparate

Methode nach SCHMID (1975 a und b):

- Vor der Präparation wird für jedes Tier ein 5 ml-Zentrifugenröhrchen mit fetalem Kälberserum gefüllt.
- Vom in Äther getöteten Tier (nicht mit Colchicin vorbehandelt) werden beide Femora herauspräpariert.
- Das proximale Ende des Femur wird mit einer feinen Schere am äußersten Ende eröffnet.
- In eine 1 ml-Spritze zieht man zuerst 0,2 ml Serum aus dem Zentrifugenröhrchen auf. Dann sticht man mit der Nadel einige Millimeter tief in den proximalen Teil der Markhöhle. Der Femur wird nun völlig in das Kälberserum eingetaucht.
- Der Femur wird mehrfach durchgespült, wobei das Knochenmark als feine Suspension neben der Nadel in die Spülflüssigkeit hinausquillt.
- Das Zentrifugenröhrchen wird 5 Min. lang bei 1000 UpM zentrifugiert. Mit einer Pasteur-Pipette wird der Überstand vollständig entfernt.
- Mit einer neuen, silikonisierten Pasteur-Pipette wird das Sediment aufpipettiert.
- Ein kleiner Tropfen der Suspension wird auf das Ende eines Objektträgers aufgebracht und ausgestrichen (Ausstrich wie Blutausstrich).
- Nach Lufttrocknung werden die Präparate gefärbt:
  3 Min. unverdünnte MAY-GRÜNWALD-Lösung
  2 Min. MAY-GRÜNWALD-Lösung mit Aqua dest. 1:1 verdünnt
  in Aqua dest. spülen
  10 Min. verdünnte GIEMSA-Lösung (1 Teil auf 6 Teile Aqua dest., z.B. 30 + 180 ml)
  in Aqua dest. gründlich spülen
- Nach weiterer Lufttrocknung wird die Rückseite der Objektträger mit Methanol gereinigt. 5 Min. in Xylol einlegen und anschließend in EUKITT einbetten.

b) Auswertungskriterien

Man wertet die nach PAPPENHEIM gefärbten Präparate nur an Stellen ziemlicher Dichte und unversehrten Materials aus. Die Erythrozyten sollten rund sein und ihre tellerförmige Gestalt noch erkennen lassen. Durch falsche osmotische Verhältnisse entstehen leicht schalenförmige (Stomatozyten), kugelförmige (Sphärozyten) oder Stechapfelformen, die zum Teil Membranfaltungen aufweisen und sich deshalb schlecht auswerten lassen. Bei schwach mutagen wirksamen Substanzen bzw. bei Stoffen, die das Knochenmark nicht stark schädigen, können poly- wie normochromatische Erythrozyten einheitlich aufgefaßt und die Mikrokerne auf die Gesamtzahl aller Erythrozyten bezogen werden. Ist bei starken Mutagenen (wie Cyclophosphamid) eine Knochenmarkdepression mit Verschiebungen des sonst konstanten Verhältnisses polychromatischer Erythrozyten zu normochromatischen Erythrozyten zu erwarten, so müssen die Mikrokerne auf beide Zelltypen getrennt bezogen werden (SCHMID, 1975 a). In den Experimenten dieser Arbeit (Cyclophosphamid !) wurden deshalb pro Präparat sowohl 1000 poly- als auch 1000 normochromatische Erythrozyten abgezählt und die festgestellten Mikrokerne dem jeweiligen Zelltyp zugeordnet. Da dies simultan mit mechanischen Zählwerken geschah, konnte als Nebenprodukt der Auswertung auch das Zahlenverhältnis der beiden Zelltypen (ohne Berücksichtigung der Mikrokernraten) registriert werden, wenn bei 1000 ausgezählten Zellen des einen Typs die bis dahin zustandegekommene Zahl des anderen Zelltyps abgelesen bzw. festgehalten wurde.

Pro Präparat wurde also folgendes registriert:
- Mikrokerne in 1000 polychromatischen Erythrozyten
- Mikrokerne in 1000 normochromatischen Erythrozyten
- und das relative Zahlenverhältnis polychromatischer zu normochromatischen Erythrozyten.

Mit einer wesentlichen Erhöhung der Mikrokernrate bei normochromatischen Erythrozyten konnte von vornherein nicht gerechnet werden (vgl. Kapitel II, 4.). Um Hinweise auf irgendwelche Vorschädigungen der Tiere, wie z.B. Virusinfektionen, zu erhalten, wurde jedoch auch diese Rate (als eine Art Positivkontrolle) mit bestimmt.

Differentialdiagnostische Entscheidungen

Die Differentialdiagnose der Mikrokerne ist umfangreich. Karyorhexis- und Pyknosis-Gebilde als Zeichen pathologischen Zelluntergangs und Klumpen basophilen Materials von Mikrokerngröße erinnern zuweilen tatsächlich an Mikrokerne. Eine differentialdiagnostische Entscheidung beim Vorliegen basophilen Materials ist nur dann möglich, wenn die Klumpen weit mehr als 1/5 des Zelldurchmessers ausmachen oder noch weitere gleichartige, aber kleinere Klumpen in der Zelle aufzufinden sind. Auch einzelne Relikte einer Karyorhexis lassen sich von Mikrokernen schwer unterscheiden, wenn sie so groß sind wie Mikrokerne. Die Mikrokernrate mag durch solche Figuren, allerdings nicht wesentlich, erhöht sein. Die basophile Tüpfelung, typische Antwort junger Erythrozyten auf eine Bleiintoxikation, dürfte differentialdiagnostisch keine Rolle spielen. Sehr gut können Mikrokerne dagegen durch Färberückstände imitiert werden, die sich räumlich über den Zellen, d.h. also extrazellulär, in der eingetrockneten Suspensionsmasse befinden oder an Proteinen der Zellmambran haften.

Wirkliche Schwierigkeiten dürften darüber hinaus nur noch die Granula geplatzter basophiler Leukozyten bereiten (SCHMID, 1973), die vorwiegend bei der Ratte beobachtet wurden und letztlich, nach schlechter Präparationstechnik, auch Membranfaltungen, die allerdings durch Fokussieren des optischen Systems am Mikroskop als solche identifiziert werden können.

Andere an Mikrokerne erinnernde Gebilde können recht gut von echten Mikrokernen unterschieden werden. Zu diesen Gebilden zählen z.B. Thrombozyten, die den Erythrozyten zuweilen aufgelagert sind (MILLER, 1973). JENSSEN (1974) beschreibt multiple staub- und fadenförmige basophile Einschlüsse in Erythrozyten nach Aminoacridingabe, die sich bei spezieller Anfärbung als Nucleolenfragmente herausstellen und nur entfernt an Mikrokerne erinnern. Chromatinstäubchen (BEGEMANN u. RASTETTER, 1972) bzw. rotviolette, sogenannte azidophile Granula (BESSIS, 1973) als pathologische Verteilungen von Chromatin in der Zelle und die PAPPENHEIM'schen Körperchen (BESSIS, 1973), die aus Ribosomen, Mitochondrien und degenerierten Membranen bestehen, können zwar hin und wieder beobachtet werden, sind aber für die Auswertung nicht relevant.

6. Statistische Sicherung

Zur statistischen Sicherung der gewonnenen Daten wurde der χ^2-Test herangezogen. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p < 0{,}01$ festgelegt. Da Cyclophosphamid als Testsubstanz bekanntermaßen stark mutagen ist und die Mutagenität bei den hohen Dosen der hiesigen Experimente außer Frage stand, konnte davon ausgegangen werden, daß ein einseitiger Test bei der Prüfung der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse vorlag. Die errechneten p-Werte konnten deshalb zusätzlich halbiert werden. Für die Objektivierung unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Verhaltens bei den einzelnen Aberrationsklassen wurde der PFANZAGL-Trendtest herangezogen (vgl. Kap. VI, 2.a).

V. Ergebnisse

1. Chromosomenanalyse des Knochenmarks

In den Tabellen 3 und 4 sind die wichtigsten Daten, die mit der Chromosomenanalyse des Knochenmarks erhoben werden konnten, dargestellt. Die Werte, die nach einem Aufarbeitungsintervall von 12 Stunden resultierten, sind in Tabelle 3, die 24 Std.-Werte in Tabelle 4 aufgezeichnet. Die Kontrollwerte wurden der Übersicht halber in beide Tabellen aufgenommen; sie sind, da aus einer einzigen Kontrollgruppe stammend, in beiden Tabellen identisch. Die Daten von Tabelle 3 und 4 sind außerdem noch anschaulich aus den Abbildungen 15 und 16 zu ersehen.

Wie erwartet, stieg der Anteil an Pulverisationen nur unwesentlich an; in der Kontrolle wie auch nach 13,3 mg/kg Cyclophosphamid erschien keine pulverisierte Metaphase. Wegen der fehlenden Eindeutigkeit ihrer Genese wurden die Pulverisationen aus der Linie Gaps - Brüche - Exchanges herausgenommen und an den Anfang gestellt (vgl. Kap. IV, 4.b). Immerhin zeigt ihre größere Häufigkeit nach Gabe von 40 bzw. 120 mg/kg Cyclophosphamid (Tab. 4), daß nach 24 Stunden Aufarbeitungszeit ein größerer Teil des geschädigten Kernmaterials in pulverisierter Form vorlag als nach 12stündiger Aufarbeitungszeit.

Die Anzahl der achromatischen Läsionen (Gaps) blieb nach beiden Aufarbeitungszeiten von der Höhe der applizierten Cyclophosphamid-Dosis relativ unabhängig. Ein geringerer Anstieg gegenüber den Kontrollwerten war eher nach 12stündigem als nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall zu verzeichnen.

Die Anzahl der Brüche und Fragmente stieg beim 12 Std.-Intervall kontinuierlich an, während nach 24stündigem Intervall ein steilerer Anstieg bis zum 40 mg-Wert auffällt. Der 120 mg-Wert beträgt nur mehr die Hälfte des

40 mg-Wertes (vgl. in der Diskussion den Abschnitt "Knochenmarkdepression").

Bei den Exchanges war ein analoges Abfallen des 120 mg-Wertes ebenfalls nach 24stündiger Aufarbeitungszeit zu beobachten. Ansonsten nahmen die Aberrationen dieses Schweregrades der Tendenz nach von 0 bis 120 mg/kg Cyclophosphamid stark zu, und zwar am deutlichsten nach 12stündiger Aufarbeitungszeit.

Die Gesamtaberrationszahlen zeigen ein ähnliches Bild wie die Mutationszahlen: bei den Zahlen einschließlich Pulverisationen und Gaps (= "aberrant incl. Gaps") ist ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme nach beiden Aufarbeitungsintervallen (einschließlich Abfall des 120 mg-Wertes nach 24stündigem Intervall) sichtbar. In ähnlicher Weise fällt auch die Gesamtaberrationsrate ohne Einbeziehung der Gaps (= "aberrant excl. Gaps") aus; die entsprechende Rubrik wurde, da sie später zum Vergleich mit den Mikrokernraten herangezogen wird, zwecks besserer Auffindbarkeit an das Ende der Tabellen gesetzt (vgl. Kap. VI, 1.a). Die mit dem χ^2-Test ermittelten p-Werte sind ohne Ausnahme signifikant gegenüber der Kontrolle.

Der Blick auf die Abbildungen 15 und 16, die dieselben Ergebnisse in graphischer Form präsentieren, läßt bei grober Einschätzung ein lineares Dosis-Wirkungs-Verhalten als Interpretation zu. Es sei darauf hingewiesen, daß eine Objektivierung dieses Verhaltens durch parametrische Verfahren wegen der geringen Anzahl von Stützpunkten (nur drei Dosierungen) nicht möglich ist. - Die Kontrollrate excl. Gaps muß mit 1,6 % als etwas erhöht bezeichnet werden, da die in der Literatur genannten Werte im Durchschnitt um 0,5 % niedriger liegen (vgl. Diskussion).

Die Einzelergebnisse der Chromosomenanalyse wurden in den Tabellen 5 und 6 hinzugefügt. Es zeigt sich zwar hin und wieder ein weit ausscherender Wert, im Ganzen aber ist die Streubreite der Ergebnisse nicht allzu

groß. Die Einzelwerte der pulverisierten Metaphasen, Gaps und Brüche liegen ziemlich homogen beieinander, während die Werte bei den Exchanges heterogener erscheinen.

2. Mikrokerntest

Die Tabellen 7 und 8 enthalten die wichtigsten Ergebnisse des Mikrokerntests und können mit den entsprechenden Tabellen der Chromosomenanalyse (Tabellen 3 und 4) verglichen werden.

Entsprechend der getrennten Registrierung von Mikrokernen in normochromatischen Erythrozyten einerseits und polychromatischen Erythrozyten andererseits erscheinen die Mikrokernraten der normo- bzw. polychromatischen Erythrozyten in getrennten Spalten. Da eine nennenswerte Erhöhung der Mikrokernrate bei normochromatischen Erythrozyten weder objektiviert noch erwartet wurde, erübrigte sich in dieser Spalte die Angabe von p-Werten aus dem χ^2-Test.

Die Mikrokernrate bei polychromatischen Erythrozyten zeigt ein deutlich positives Dosis-Wirkungs-Verhalten. Auffällig ist der hohe Anteil mikrokernhaltiger polychromatischer Erythrozyten nach Gabe von 120 mg/kg Cyclophosphamid und 12stündiger Aufarbeitungszeit , während der korrespondierende Anteil nach 24stündigem Intervall demgegenüber als relativ gering zu bezeichnen ist (vgl. in der Diskussion den Abschnitt "Knochenmarkdepression"). Da pro Dosis und Intervall 5000 polychromatische Erythrozyten (neben den 5000 normochromatischen Erythrozyten) auf Mikrokerne hin untersucht wurden und spontan kaum Mikrokerne auftraten (Kontrolle), sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich auf diese Spalte beziehen, äußerst gering.

In den Abbildungen 17 und 18 (den Abbildungen 15 und 16 der Chromosomenanalyse vergleichbar) sind die Mikrokernraten beider Erythrozytenarten gemeinsam dargestellt. Das unterschiedliche Verhalten der normo- und polychromatischen Erythrozyten kommt in diesen Säulendiagrammen besonders deutlich zum Ausdruck. - Lediglich in der Kontrolle ist der Anteil von Mikrokernen in normochromatischen Erythrozyten mit 3 °/oo höher als der Anteil der Mikrokerne in polychromatischen Erythrozyten mit 2,3 °/oo.

In den Tabellen 7 und 8 ist neben den Mikrokernraten auch das zahlenmäßige Verhältnis von normo- zu polychromatischen Erythrozyten eingetragen. Der Anteil polychromatischer Erythrozyten verhält sich hierbei umgekehrt proportional zur Höhe der applizierten Cyclophosphamid-Dosis. Die relative Abnahme polychromatischer Erythrozyten ist zum 120 mg-Wert hin stärker als bei niedrigen Dosierungen, was besonders für den Wert nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall zutrifft. Das genannte Zahlenverhältnis ist auch in Form von Säulendiagrammen in den Abbildungen 19 und 20 festgehalten, wobei wiederum die 120 mg-Werte optisch auffallen.

Zur Darstellung der Streubreite der Einzelergebnisse wurden auch hier die pro Tier, d.h. die pro 1000 normo- bzw. 1000 polychromatischen Erythrozyten gewonnenen Einzelwerte tabellarisch angefügt (Tabellen 9 und 10): die Mikrokernraten bei normochromatischen Erythrozyten lagen bei allen fünf Tieren jeweils sehr nahe beieinander, während die Werte unter den polychromatischen Erythrozyten größere Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren erkennen lassen.

Abschließend sei erwähnt, daß ähnlich wie bei der Chromosomenanalyse auch hier parametrische Verfahren zur Objektivierung linearer oder exponentieller Dosis-Wirkungs-Kurven wegen der geringen Anzahl der Stützpunkte

auszuschließen sind. Der Blick auf die Abbildungen 17 und 18 läßt allerdings auf ein annähernd lineares Verhalten im Auftreten der Mikrokerne schließen.

Tab. 3 Ergebnisse der Chromosomenanalyse, 12-Std. Intervall

Serie	Metaphasen analysiert	Pulverisationen		Gaps		Brüche		Exchanges		aberrant incl.Gaps		p-Werte	aberrant excl.Gaps		p-Werte
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		n	%	
Kontrolle	500	0	0	18	3,6	5	1,0	3	0,6	26	5,2	--	8	1,6	--
13,3 mg	500	0	0	40	8,0	38	7,6	19	3,8	97	19,4	10^{-10}	57	11,4	$2,5 \cdot 10^{-10}$
40 mg	500	4	0,8	33	6,6	48	9,6	79	15,8	164	32,8	10^{-10}	131	26,2	10^{-10}
120 mg	500	9	1,8	44	8,8	53	10,6	150	30,0	256	51,2	10^{-10}	212	42,4	10^{-10}

Tab. 4 Ergebnisse der Chromosomenanalyse, 24 Std.-Intervall

Serie	Metaphasen analysiert	Pulverisationen n	%	Gaps n	%	Brüche n	%	Exchanges n	%	aberrant incl.Gaps n	%	p-Werte	aberrant excl.Gaps n	%	p-Werte
Kontrolle	500	0	0	18	3,6	5	1,0	3	0,6	26	5,2	--	8	1,6	--
13,3 mg	500	0	0	22	4,4	26	5,2	6	1,2	54	10,8	$3x10^{-10}$	32	6,4	$7x10^{-5}$
40 mg	500	6	1,2	25	5,0	56	11,2	77	15,4	164	32,8	10^{-10}	139	27,8	10^{-10}
120 mg	500	11	2,2	25	5,0	26	5,2	48	9,6	110	22,0	10^{-10}	85	17,0	10^{-10}

Abb.15 Ergebnisse der Chromosomenanalyse
12 Std.-Intervall

Zahlen über den Säulen: Gesamtaberrationsraten incl.(excl.) Gaps

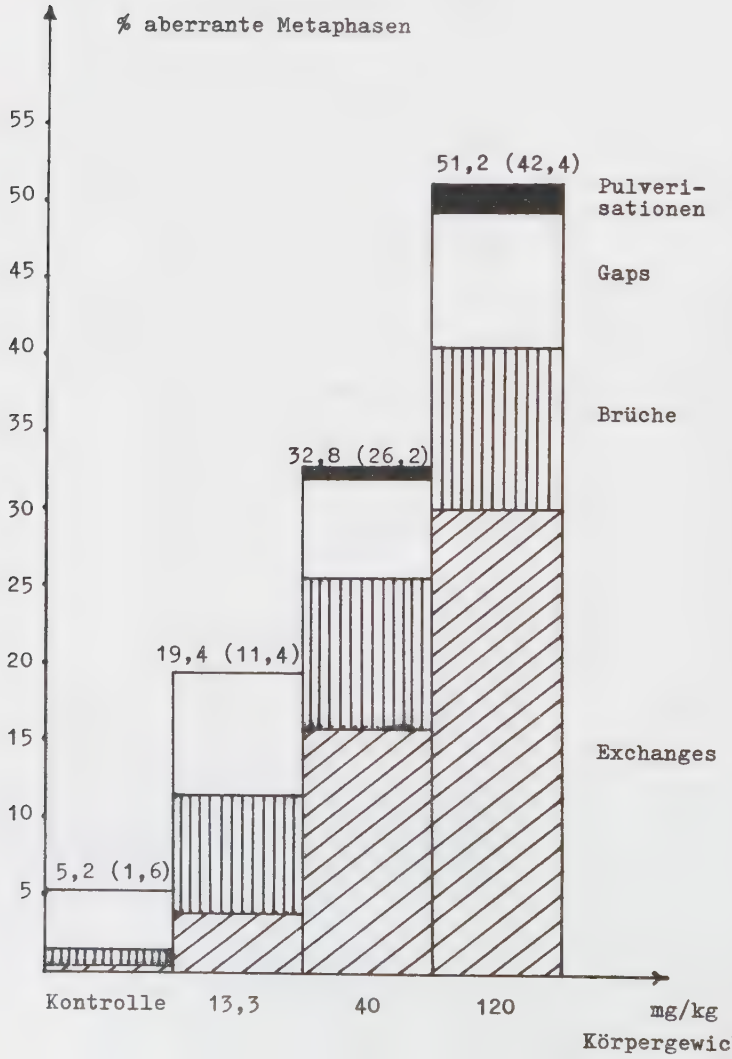
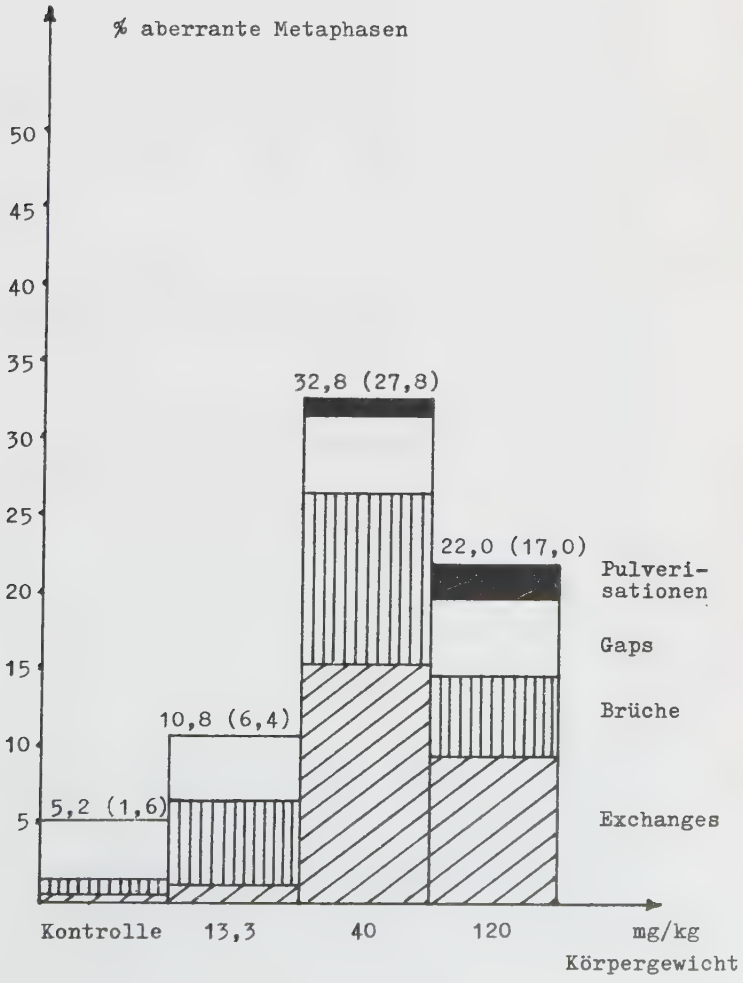


Abb.16 Ergebnisse der Chromosomenanalyse
24 Std.-Intervall

Zahlen über den Säulen: Gesamtaberrationsraten incl.(excl.) Gaps



Tab. 5 Einzelergebnisse der Chromosomenanalyse, 12 St.-Intervall

Serie	Pulverisationen		Gaps		Brüche		Exchanges		aberrant incl.Gaps		aberrant excl.Gaps	
	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$
Kontrolle	0		1		1		1		3		2	
	0		3		1		2		6		3	
	0	0	3	3,6	0	1,0	0	0,6	3	5,2	0	1,6
	0		6		3		0		9		3	
	0		5		0		0		5		0	
13,3mg	0		7		8		3		18		11	
	0		18		7		5		30		12	
	0	0	4	8,0	6	7,6	3	3,8	13	19,4	9	11,4
	0		6		8		6		20		14	
	0		5		9		2		16		11	
40 mg	0		6		7		6		19		13	
	1		3		14		24		42		30	
	3	0,8	5	6,6	12	9,6	21	15,8	41	32,8	36	26,2
	0		10		9		13		32		22	
	0		9		6		15		30		21	
120 mg	2		8		9		38		57		49	
	1		8		10		28		47		39	
	2	1,8	11	8,8	14	10,6	18	30,0	45	51,2	34	42,4
	1		11		11		33		56		45	
	3		6		9		33		51		45	

Tab. 6 Einzelergebnisse der Chromosomenanalyse, 24 Std.-Intervall

Serie	Pulverisationen		Gaps		Brüche		Exchanges		aberrant incl.Gaps		aberrant excl.Gaps	
	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$
Kontrolle	0		1		1		1		3		2	
	0		3		1		2		6		3	
	0	0	3	3,6	0	1,0	0	0,6	3	5,2	0	1,6
	0		6		3		0		9		3	
	0		5		0		0		5		0	
13,3mg	0		4		8		1		13		9	
	0		2		7		1		10		8	
	0	0	3	4,4	2	5,2	2	1,2	7	10,8	4	6,4
	0		5		5		1		11		6	
	0		8		4		1		13		5	
40 mg	0		4		17		20		41		37	
	0		9		11		8		28		19	
	3	1,2	3	5,0	14	11,2	23	15,4	43	32,8	40	27,8
	0		6		8		10		24		18	
	3		3		6		16		28		25	
120 mg	3		6		9		13		31		25	
	0		3		6		2		11		8	
	0	2,2	4	5,0	6	5,2	9	9,6	19	22,0	15	17,0
	8		9		3		22		42		33	
	0		3		2		2		7		4	

Tab. 7 Ergebnisse des Mikrokerntests, 12 Std.-Intervall

Serie	Verhältnis n:n	Normochromatische Erythrozyten			Polychromatische Erythrozyten			
	normo- poly-chrom. chrom. Erythr. Erythr.	ausgewertet	mit Mikrokern		ausgewertet	mit Mikrokern		
		n	n	°/oo	n	n	°/oo	p-Werte
Kontrolle	1000 : 675	6000	18	3,0	6000	14	2,3	---
13,3 mg	1000 : 580	5000	27	5,4	5000	36	7,2	10^{-4}
40 mg	1000 : 533	5000	22	4,4	5000	102	20,4	10^{-10}
120 mg	1000 : 284	5000	23	4,6	5000	464	92,8	10^{-10}

Tab. 8 Ergebnisse des Mikrokerntests, 24 Std.-Intervall

Serie	Verhältnis n:n normochrom. Erythr. : polychrom. Erythr.	Normochromatische Erythrozyten ausgewertet	mit Mikrokern		Polychromatische Erythrozyten ausgewertet	mit Mikrokern		
		n	n	°/oo	n	n	°/oo	p-Werte
Kontrolle	1000 : 675	6000	18	3,0	6000	14	2,3	---
13,3 mg	1000 : 564	5000	32	6,4	5000	40	8,0	$1,5 \times 10^{-5}$
40 mg	1000 : 671	5000	20	4,0	5000	174	34,8	10^{-10}
120 mg	1000 : 144	5000	35	7,0	5000	316	63,2	10^{-10}

Abb.17 Ergebnisse des Mikrokerntests
12 Std.-Intervall

Zahlen über den Säulen: Mikrokernraten bei polychromatischen (normochromatischen) Erythrozyten

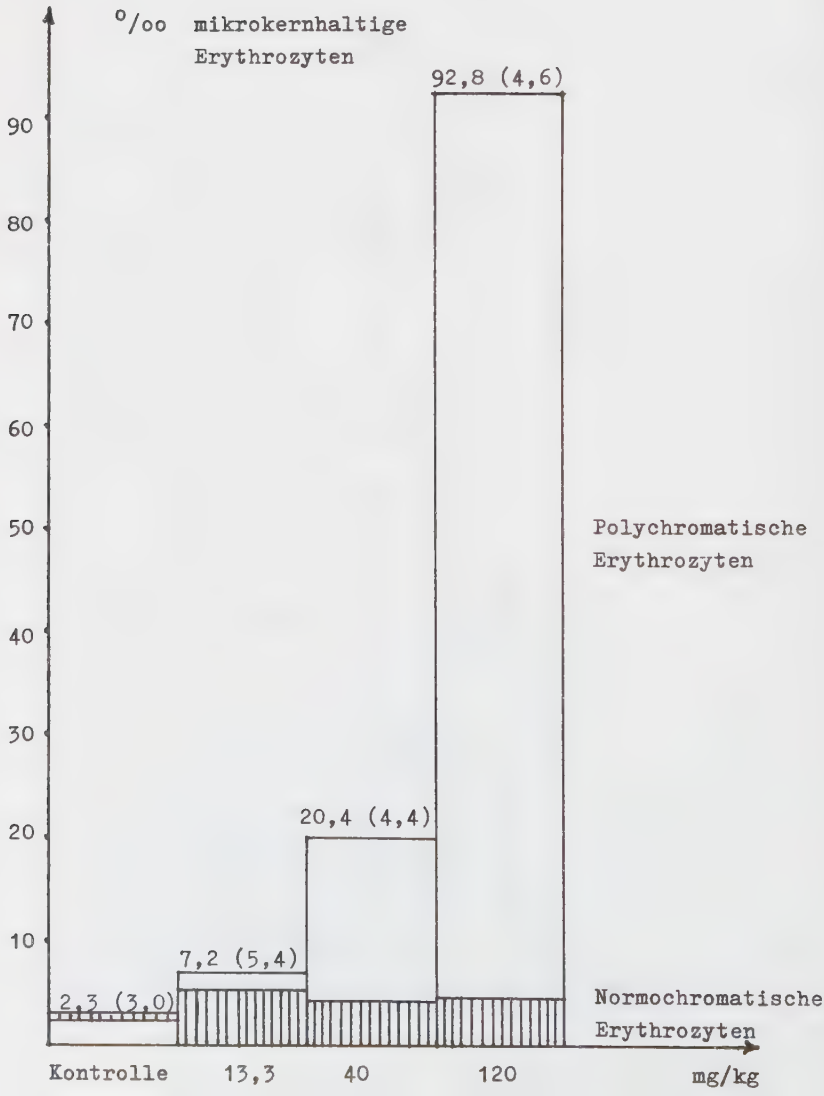


Abb.18 Ergebnisse des Mikrokerntests
24 Std.-Intervall

Zahlen über den Säulen: Mikrokernraten bei polychromatischen (normochromatischen) Erythrozyten

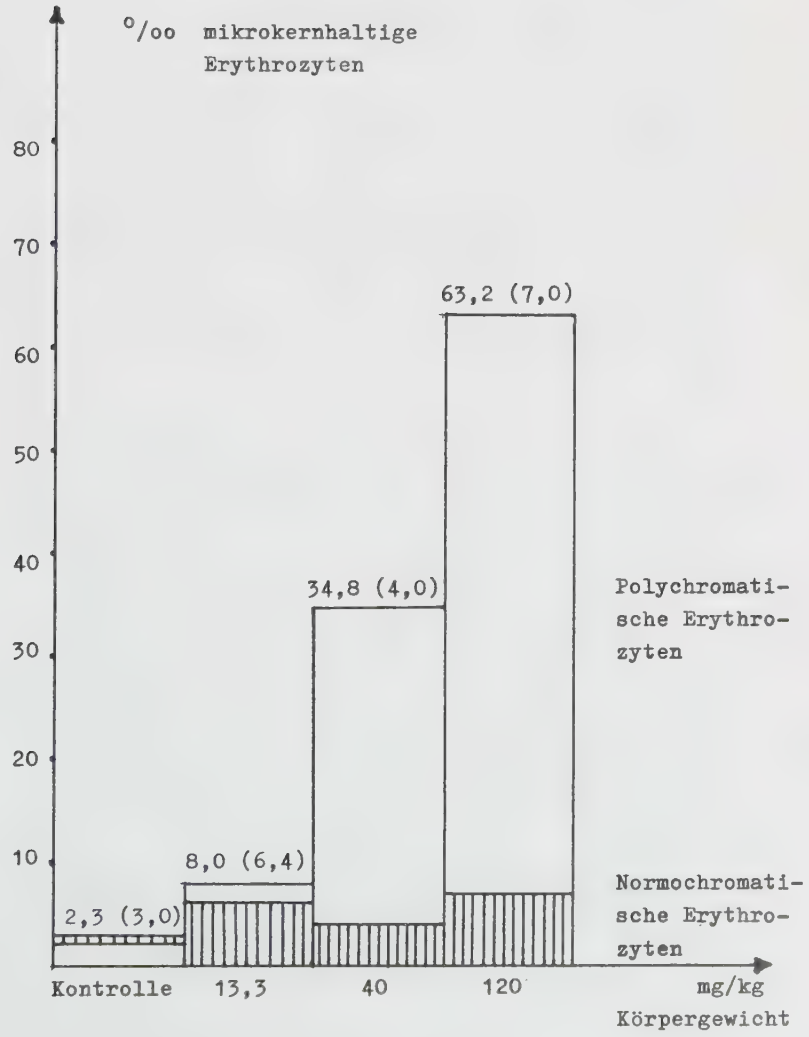


Abb.19 Verhältnis normochr./polychromatische Erythrozyten im Mikrokerntest. Auf 1000 normochromatische Erythrozyten entfielen n polychromatische Erythrozyten. 12 Std.-Intervall.

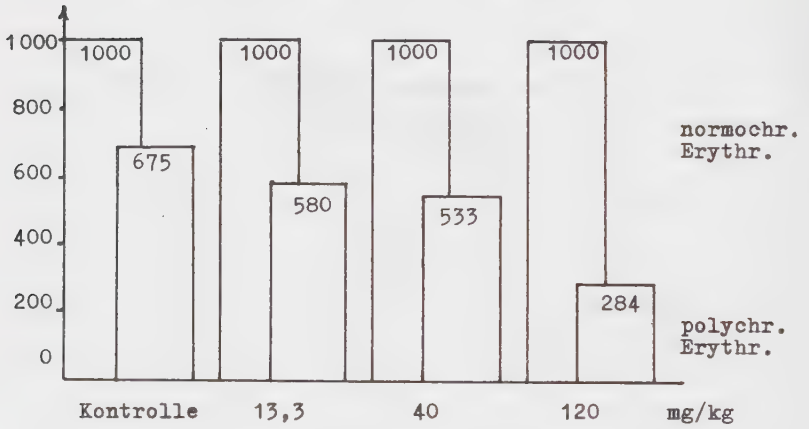
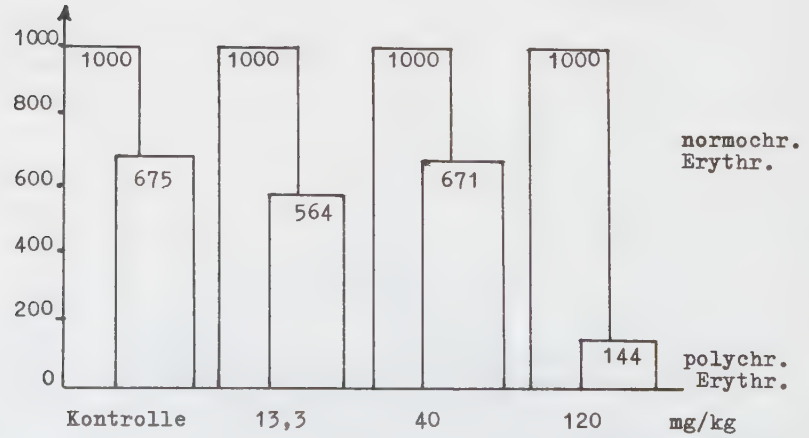


Abb.20 Wie Abb.19. 24 Std.-Intervall



Tab. 9 Einzelergebnisse des Mikrokerntests, 12 St.-Intervall

Serie	Mikrokerne in normochromat. Erythrozyten		Mikrokerne in polychromat. Erythrozyten		Verhältnis 1000 normochr. Erythr. : n polychr. Erythr.	
	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$
Kontrolle (x_{1-6})	4		3		765	
	6		1		684	
	3		3		465	
	2	3,0	3	2,3	907	675
	2		1		567	
	1		3		660	
13,3 mg	4		4		387	
	7		13		668	
	7	5,4	8	7,2	670	580
	3		6		382	
	6		5		794	
40 mg	3		20		530	
	5		32		319	
	2	4,4	23	20,4	622	533
	5		11		341	
	7		16		854	
120 mg	5		90		262	
	5		81		321	
	4	4,6	130	92,8	194	284
	2		60		312	
	7		103		329	

Tab. 10 Einzelergebnisse des Mikrokerntests, 24 Std.-Intervall

Serie	Mikrokerne in normochromat. Erythrozyten		Mikrokerne in polychromat. Erythrozyten		Verhältnis 1000 normochr.Erythr. : n polychr. Erythr.	
	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$	x_{1-5}	$\bar{x}$
Kontrolle (x_{1-6})	4 6 3 2 2 1	3,0	3 1 3 3 1 3	2,3	765 684 465 907 567 660	675
13,3 mg	6 5 7 5 9	6,4	7 3 11 3 16	8,0	483 619 792 501 426	564
40 mg	4 4 3 6 3	4,0	36 44 20 48 26	34,8	881 406 406 886 777	671
120 mg	7 6 11 7 4	7,0	84 79 30 51 72	63,2	122 126 139 216 119	144

VI. Diskussion

1. Vergleich von Dosis- und Intervallabhängigkeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Empfindlichkeit und Aussagekraft des Mikrokerntests mit den entsprechenden Kriterien der Chromosomenanalyse des Knochenmarks verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Chinesische Hamster (Cricetulus griseus) in sieben Behandlungsgruppen - neben der Kontrolle drei Dosen mit je zwei Aufarbeitungsintervallen - mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid (Endoxan) behandelt, wobei Mikrokerntest und Chromosomenanalyse jeweils simultan an einem Tier ausgeführt wurden.

a) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven

Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden muß zunächst bemerkt werden, daß wegen der unterschiedlichen Auswertungsobjekte der Tests ein unmittelbarer Vergleich zwischen Chromosomenanalyse und Mikrokerntest nicht möglich ist: auf der einen Seite sind Chromosomenaberrationen aus Granulo- und Erythropoese-Zellen und auf der anderen Seite Mikrokerne in jungen Knochenmark-Erythrozyten Gegenstand der Betrachtung. Um dennoch beide Methoden in einigermaßen vergleichbarer Weise gegenüberzustellen, wurden die mit der Literatur ausreichend gut übereinstimmenden Kontrollraten beider Methoden (Chromosomenanalyse excl. Gaps, Mikrokerntest ohne normochromatische Erythrozyten) willkürlich gleich 1 gesetzt und die jeweiligen Behandlungswerte als X-faches dieser Basis skalar, d.h. im Sinne einer Verhältnisskala, aufgetragen (Abbildungen 21 und 22).

Der Vergleich beider Methoden in Abbildung 21 (Werte nach 12stündigem Aufarbeitungsintervall) läßt folgende Aussagen zu: Die Chromosomenanalyse zeigt eine lineare Dosisabhängigkeit, während die Dosisabhängigkeit des

Mikrokerntests aufgrund des hohen Gradienten zwischen 40 und 120 mg/kg Cyclophosphamid eher einer exponentiellen Beziehung ähnelt. Dazu trägt allerdings bei, daß die Dosisantwort des Mikrokerntests nach 13,3 und 40 mg/kg Cyclophosphamid im Verhältnis zur Dosisantwort der Chromosomenanalyse um ca die Hälfte geringer ausgefallen ist. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen der Methoden in diesem Fall soll zum Schluß der Diskussion noch einmal aufgegriffen werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall (Abb. 22) fällt neben den in beiden Methoden sehr ähnlichen Werten nach 0, 13,3 und 40 mg/kg Cyclophosphamid die geringe Höhe des 120 mg-Wertes in der Chromosomenanalyse auf. Während jedoch dieser Wert bereits im vorhergehenden Kapitel die Aufmerksamkeit auf sich lenkte, verrät erst der Blick auf die Abbildungen 23 und 24, in denen die Abhängigkeit beider Methoden vom Aufarbeitungsintervall dargestellt ist, daß auch der korrespondierende 120 mg-Wert des Mikrokerntests im Vergleich zum 12stündigen Aufarbeitungsintervall relativ zurück bleibt. Mit seinen 63,2 °/oo sinkt letzterer zwar nicht unter den 40 mg-Wert ab (wie in der Chromosomenanalyse) jedoch ist seine relativ geringe Höhe, gemessen an den 92,8 °/oo nach 12stündigem Aufarbeitungsintervall, nicht zu verkennen.

Da Mikrokerne, wenn sie nicht primär durch Spindelstörungen verursacht wurden, postmitotische Folgen von Chromosomenaberrationen sind (vgl. Kap. II , 2.), muß gerade bei simultaner Anwendung von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest an einem Tier eine zeitliche Verzögerung des Erscheinens der Mikrokerne hinter den Chromosomenaberrationen zu erkennen sein. Auf diese Verzögerung wiesen schon HEDDLE (1973) sowie KÜRTEN und OBE (1974) hin: HEDDLE gibt für Knochenmarkzellen der Maus eine Verzögerung von

12 bis 14 Std. an, während KÜRTEN und OBE bei Untersuchungen an Chinesischen Hamstern daran erinnern, daß der Zeitraum eines weiteren Zellzyklus (d.h. ebenfalls 12 bis 14 Stunden) erforderlich sei, damit die Mikrokernrate der Chromosomenaberrationsrate sich angleichen könne. Diese Angaben konnten in der vorliegenden Arbeit voll bestätigt werden: Der Vergleich der 24 Std.-Werte des Mikrokerntests (Abb. 22) mit den 12 Std.-Werten der Chromosomenanalyse (Abb. 21) zeigt, daß sich die Mikrokernrate im besagten Zeitraum tatsächlich der Chromosomenaberrationsrate angeglichen hat.

Die zuweilen hohen Übereinstimmungen in den Ergebnissen beider Methoden müssen im übrigen hinsichtlich der Einzelergebnisse am jeweiligen Tier relativiert werden. Abgesehen davon, daß die Einzelergebnisse innerhalb eines Tests und einer Behandlungsgruppe (in der Chromosomenanalyse auch eines Aberrationstyps) des öfteren erheblich schwanken, lassen sich auch die Einzelergebnisse, die an einem Tier für Chromosomenanalyse und Mikrokerntest erhältlich waren, nicht als korrelativ bezeichnen. Zum Beweis wurde eine paarweise Aufstellung der Werte der Chromosomenanalyse (Gesamtaberrationsraten excl. Gaps) und des Mikrokerntests (Zahl der am gleichen Tier gefundenen polychromatischen Erythrozyten mit Mikrokernen) in der Tab. 11 vorgenommen.

Eine Zusammenfassung der Einzelergebnisse der Tab. 11 hinsichtlich der Geschlechtszugehörigkeit der Tiere (M = Männchen, W = Weibchen) stellt Tab. 12 dar. Aus ihr können ebensowenig wie aus Tab. 11 geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Cyclophosphamid abgeleitet werden. Während MILTENBURGER (persönliche Mitteilung) in eigenen Experimenten signifikante Unterschiede dieser Art feststellen konnte, bestätigen die Angaben von RICHARDSON (1974) und SCHMID (1975 b) die eigene Feststellung, daß bei der

Abb.21 Skalarer Vergleich von Chromosomenanalyse (links) und Mikrokerntest (rechts)
12 Std.-Intervall. X-faches der Kontrolle, Kontrolle willkürlich = 1

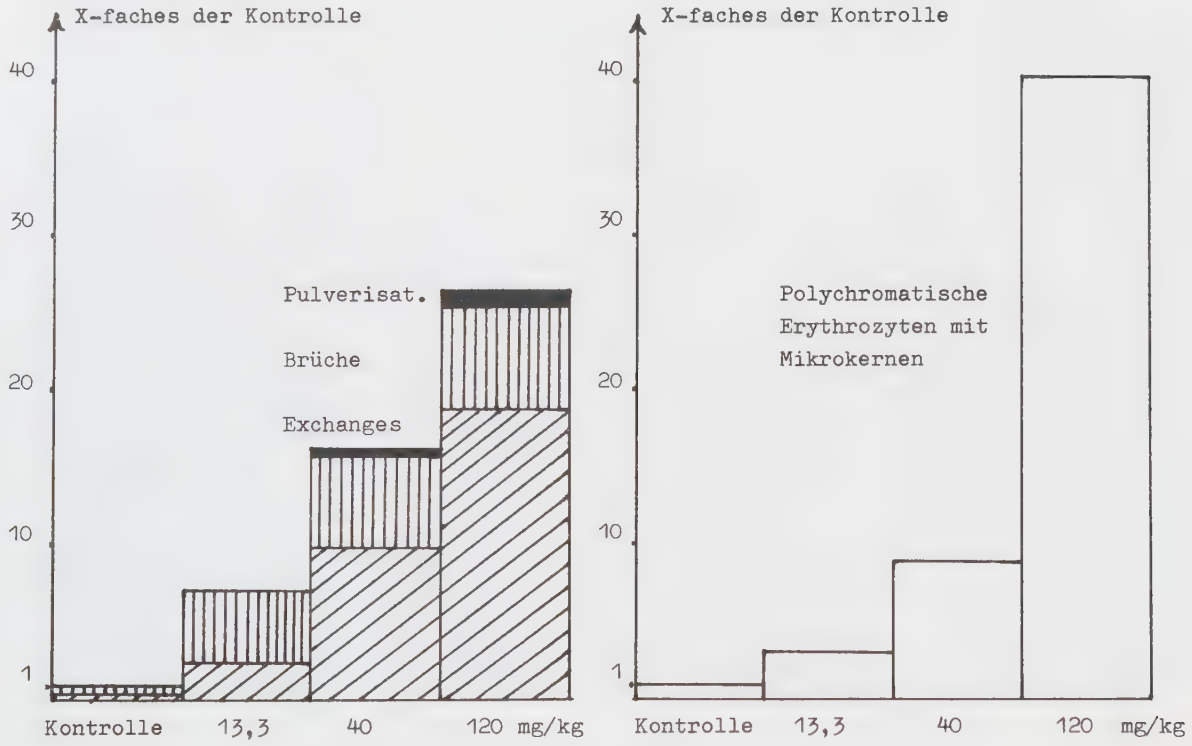


Abb.22 Skalarer Vergleich von Chromosomenanalyse (links) und Mikrokerntest (rechts)
24 Std.- Intervall. X-faches der Kontrolle, Kontrolle willkürlich = 1

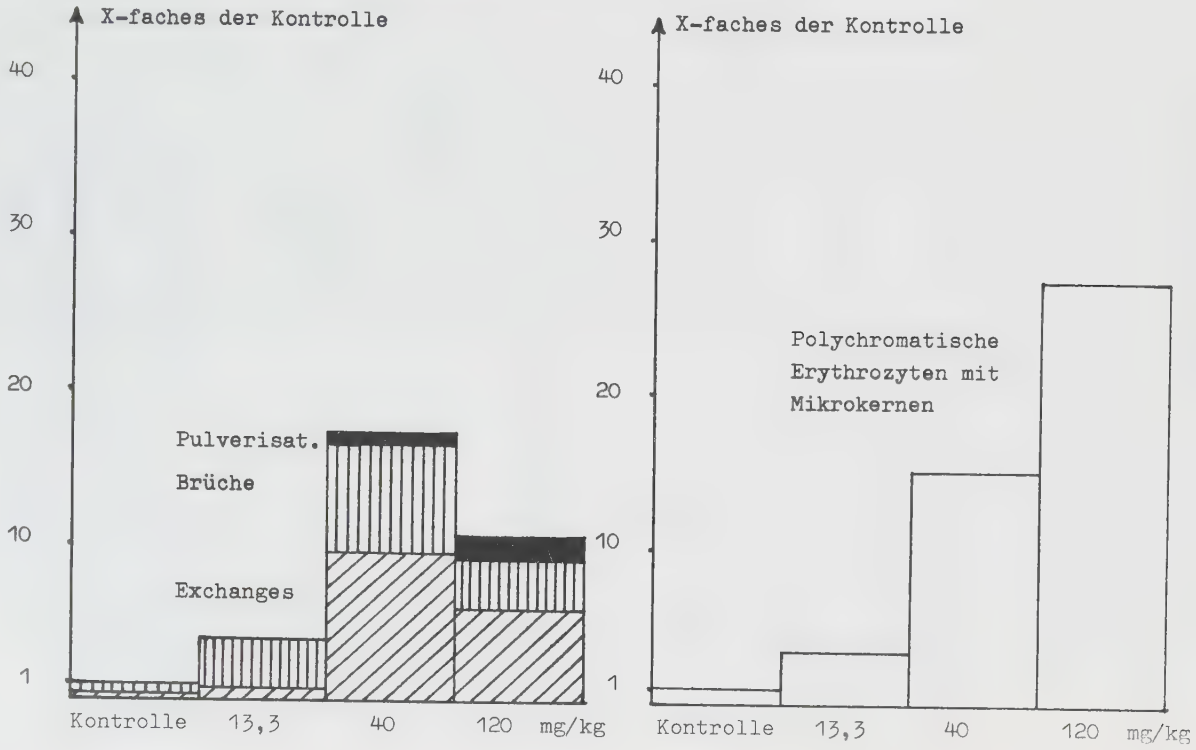


Abb.23 Abhängigkeit von der Aufarbeitungszeit in der Chromosomenanalyse

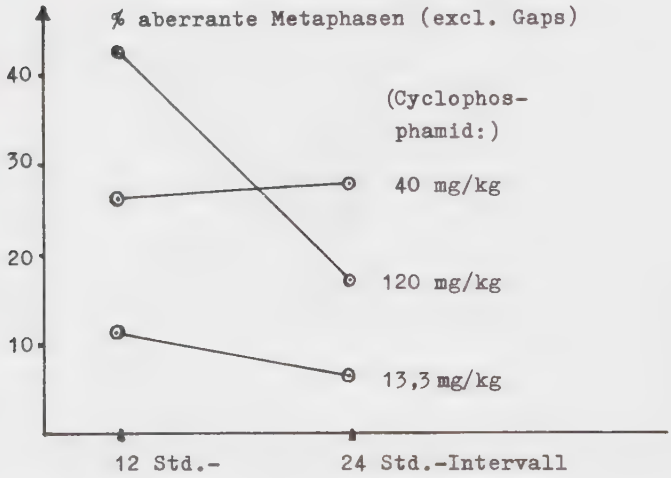
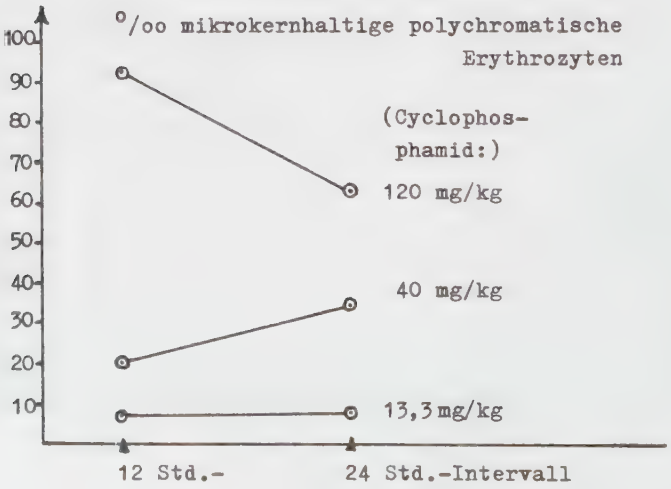


Abb.24 Abhängigkeit von der Aufarbeitungszeit im Mikrokerntest



Tab. 11 : Paarweise Aufstellung der am Einzeltier (Männchen M oder Weibchen W) gleichzeitig erhobenen Daten von Chromosomenanalyse (CA) - aberrante Metaphasen excl.Gaps- und Mikrokerntest (MT) - polychromatische Erythrozyten mit Mikrokern-

12 Std.-Intervall			
Serie	M/W	CA	MT
Kontrolle	W	2	3
	M	3	1
	W	0	3
	W	3	3
	M	0	3
	M		1
13,3mg	W	11	6
	W	12	13
	W	9	4
	M	14	8
	M	11	5
40 mg	M	13	20
	W	39	23
	W	36	16
	W	22	11
	W	21	32
120 mg	W	49	130
	W	39	103
	M	34	60
	W	45	81
	M	45	90

24 Std.-Intervall			
Serie	M/W	CA	MT
Kontrolle	W	2	3
	M	3	1
	W	0	3
	W	3	3
	M	0	3
	M		1
13,3 mg	M	9	7
	M	8	3
	W	4	11
	M	6	3
	W	5	16
40 mg	M	37	26
	W	19	20
	M	40	48
	W	18	44
	M	25	36
120 mg	M	25	72
	W	8	30
	M	15	79
	W	33	84
	W	4	51

Tab.12 Ergebnisse nach Geschlechtsunterschieden aufgeteilt (Zusammenfassung von Tab.11)

M = Männchen
W = Weibchen
CA = Chromosomenanalyse (°/o aberrant excl.Gaps)
MT = Mikrokerntest (°/oo polychromatische Erythrozyten)

	12 Std.-Intervall			
Serie	CA		MT	
	W	M	W	M
Kontrolle	1,7	1,5	3	1,7
13,3 mg	7,3	12,5	7,7	6,5
40 mg	29,5	13	17,5	32
120 mg	44,3	36,5	104,6	75

	24 Std.-Intervall			
Serie	CA		MT	
	W	M	W	M
Kontrolle	1,7	1,5	3	1,7
13,3 mg	4,5	7,7	13,5	4,3
40 mg	18,5	34	32	36,7
120 mg	15	20	55	75,5

Untersuchung somatischer Mutationen geschlechtsspezifische Reaktionsunterschiede nicht bestehen.

b) Knochenmarkdepression

Gestaltsveränderungen oder Funktionsbeeinträchtigungen einzelner oder sämtlicher Knochenmark-Zelltypen, die mit einem Absinken des Zellgehalts und einer Minderung der Proliferationsraten im Knochenmark einhergehen, können allgemein unter dem Begriff der Knochenmarkdepression subsumiert werden. Knochenmarkdepressionen lassen sich innerhalb der Mutationsforschung schon aufgrund der Versuchsanordnungen auf die spezifischen (mutagenen) bzw. unspezifischen (zytotoxischen) Wirkungen der applizierten Testsubstanz zurückführen. Der Aspekt der unmittelbaren Sichtbarkeit des Phänomens im hämatologischen Ausstrichpräparat dürfte dabei von praktischer Bedeutung für den Mikrokerntest sein. Der beschriebene Effekt von Cyclophosphamid auf das blutbildende Mark von Säugern ist ebenso wie die Wirkung der Substanz auf andere schnell proliferierende Gewebe wie Haarfollikel, Darmepithelien oder Keimdrüsen schon seit langem bekannt und als unwillkommene Nebenwirkung bei der therapeutischen Anwendung in der Medizin gefürchtet.

Klinisch-hämatologisch konnten bei Endoxan-bedingten Knochenmarkdepressionen neben einer Verminderung der Gesamtzellzahlen makro- bis megaloblastische Reifungsstörungen der Erythropoese und deutlich degenerative Schädigungszeichen, besonders der granulopoetischen Zellen, beobachtet werden (KÜHBÖCK u. Mitarb., 1968). Zu diesen Schädigungszeichen gehören u.a. Karyorhexis, Pyknosis und Zerfallserscheinungen am Cytoplasma, die größtenteils zum Absterben der Zellen führen. - Gewöhnlich dringt in den Raum, den die absterbenden Zellen freimachen, peripheres Blut in Form diffuser Blutungen ein. Nach KAUFMANN und STAEMMLER (1955) können die mit

Knochenmarkdepressionen einhergehenden Störungen der Knochenmark-Endothelschranke ebenfalls zu diffusen Blutungen Anlaß geben, wenn nicht gar hämorrhagische Diathesen infolge peripherer Thrombozytopenien für sie verantwortlich zu machen sind.

Bezogen auf die Resultate, die bei den eigenen Untersuchungen an Chinesischen Hamstern gewonnen wurden, können über die Knochenmarkdepression folgende Angaben gemacht werden:
In der Chromosomenanalyse war die Knochenmarkdepression nach Gabe von 120 mg/kg Cyclophosphamid erst nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall erkennbar. Während dieser Zeitspanne nahm der Anteil schwerstgeschädigter Zellen durch sukzessiven Zelltod derart ab, daß zum Zeitpunkt der Aufarbeitung nur noch ein Rest von ihnen vital war und zur Auswertung gelangen konnte. Im Gegensatz zum 12 Std.-Intervall, in welchem offenbar die meisten dieser Zellen noch auswertbar waren, mußte deshalb die Aberrationsrate niedriger geraten als man hätte erwarten können. Parallel zu dieser niedrigen Aberrationsrate wurde eine relativ hohe Ausbeute an pulverisierten Metaphasen festgestellt, was auch SCHMID u. Mitarb. (1971) in ihrer Arbeit registrierten.

Im Mikrokerntest kann eine Knochenmarkdepression unmittelbar aus dem Zellverhältnis polychromatischer und normochromatischer Erythrozyten - bezogen auf das Zellverhältnis in der Kontrolle - abgelesen werden. Dies war im Kapitel "Ergebnisse"besonders aus den Abb. 19 und 20 ersichtlich, die auf eine merkliche Reduzierung der polychromatischen Erythrozyten gegenüber den normochromatischen Erythrozyten gerade nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall hinwiesen. Die relative Zunahme normochromatischer Erythrozyten erklärt sich mit der schon erwähnten Schädigung der Knochenmark-Endothelschranke einerseits

und den Freiräumen andererseits, die nach Absterben der Knochenmark-Parenchymzellen entstehen und später die diffusen Blutungen ermöglichen. Entsprechende Belege finden sich u.a. bei BOLLER und SCHMID (1970), SCHMID (1972), VON LEDEBUR und SCHMID (1973) und bei MATTER und GRAUWILER (1974).

Es darf im Gegensatz zu den Angaben von SCHMIDT (1975 a) übrigens nicht davon ausgegangen werden, daß poly- und normochromatische Erythrozyten genau im Verhältnis 1:1 vorlägen. Aus den Abbildungen 19 und 20 ist abzulesen, daß bereits in der Kontrolle auf 1000 normochromatische Erythrozyten nur 675 polychromatische Erythrozyten kamen und daß die Zahl polychromatischer Erythrozyten dann kontinuierlich, d.h. nicht erst bei manifester Knochenmarkdepression, weiter abnahm. RUPPERT (1977) ermittelte zwar tatsächlich in der Kontrolle ein Verhältnis von 1000 normo- zu 934 polychromatischen Erythrozyten, d.h. nahezu ein Verhältnis von 1:1, erhielt aber nach Applikation von nur 0,25 ml/kg Benzol an Chinesischen Hamstern ein Verhältnis von 1000 normo- zu 494 polychromatischen Erythrozyten, d.h. nahezu ein Verhältnis von 2:1 zugunsten der normochromatischen Erythrozyten. Auch VICTOR (1978) registrierte Werte in der Größenordnung von 1,4:1 bis 2:1 zugunsten der normochromatischen Erythrozyten. Eine Knochenmarkdepression kann also erst dann vermutet werden, wenn sich die Zellverhältnisse relativ zur individuellen Kontrolle drastisch geändert haben und nicht etwa schon dann, wenn ein einmalig definiertes Verhältnis normo- und polychromatischer Erythrozyten vorliegt.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven des Mikrokerntests sind kaum Rückschlüsse auf das Vorliegen oder Ausbleiben einer Knochenmarkdepression zu erwarten, da die mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten als einzig

relevante Zellen im Beobachtungszeitraum von 12 bis 24 Stunden nicht zugrunde gehen und das Entstehen von Intervallunterschieden somit unwahrscheinlich ist.Dennoch verlangt das - wenn auch geringe - relative Defizit an Mikrokernen bei 120 mg/kg Cyclophosphamid und 24stündigem Aufarbeitungsintervall, wie es aus Abb. 24 hervorging, eine Erklärung. Es könnte sein, daß sich infolge des sukzessiven Zelltodes vieler schwerstgeschädigter Erythropoese-Zellen (vgl. Chromosomenanalyse) und der zeitlichen Verzögerung des Auftretens der Mikrokerne hinter den Chromosomenaberrationen (s.o.) andeutungsweise auch eine relative Senkung der Mikrokernrate nach 24stündigem Aufarbeitungsintervall eingestellt hätte. Die geringe Höhe dieses Defizites ließe eine solche Erklärung zur Not zu.

c) Literaturvergleich (Cyclophosphamid)

Der Vergleich der eigenen Befunde mit den Befunden anderer Autoren, die allerdings unter anderen Aspekten die mutagene Wirkung von Cyclophosphamid am Chinesischen Hamster untersuchten, bietet sich an dieser Stelle an. Entsprechende Daten sind in Tab. 13 zusammengetragen. Besonders hervorzuheben sind dabei die Ergebnisse von MÜLLER, LANGAUER u.Mitarb. (1972), die ebenfalls Chromosomenanalyse und Mikrokerntest miteinander verglichen. Allerdings wählten sie andere Dosierungen, applizierten oral und gingen von dem damals noch nicht für die Routinetestung weiterentwickelten Mikrokerntest aus. Auch sie fanden nach Cyclophosphamidgabe eine klare Dosisabhängigkeit und eine zufriedenstellende Korrelation der beiden Methoden. Leider verwandten sie für beide Methoden unterschiedliche Aufarbeitungszeiten, so daß es nicht möglich ist, anhand ihrer Daten eine wirklich kritische Entscheidung zu treffen.

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse von VICTOR (1978) mit den eigenen Ergebnissen sei ebenfalls hervorgehoben.

Tabelle 13 Literaturvergleich: Dosis-Effekt-Beziehungen von Cyclophosphamid

Dosis Cyclophosphamid (zweimalige Applikation)	Ergebnisse: Chromosomenanalyse % excl. Gaps	Ergebnisse: Mikrokerntest ‰ polychr.E.	Aufarbeitungsintervall h	Autoren (Bemerkungen)
19 mg i.p. 37,5 mg i.p. 150 mg i.p.		4 12 39,8	6	MATTER u. GRAUWILER,1974 (Testung v. Mäusen)
32 mg oral 64 mg oral 128 mg oral	3,5 9,0 12,2		6	MÜLLER, LANGAUER u. Mitarb.,1972 (in Kontrolle 2,8 % Gaps) (Mikrokerntest: einschließlich normochromatischer Erythrozyten)
32 mg oral 64 mg oral 128 mg oral		ca. 5 ca. 20 ca. 70	18	
32 mg oral 64 mg oral 128 mg oral		ca. 15 ca. 35 ca. 110	24	
13,3 mg i.p. 40 mg i.p. 120 mg i.p.	1,5 10,8 16,0		8	HERWIG,1973
40 mg i.p.	22,2		24	RÖHRBORN u. BUCKEL, 1976 (in Kontrolle 2,9 % Gaps)
40 mg i.p.	21,2	20,6		VICTOR,1978 (fünfmalige Applikation)
13,3 mg i.p. 40 mg i.p. 120 mg i.p.	11,4 26,2 42,4	7,2 20,4 92,8	12	Eigene Untersuchungen (in Kontrolle 3,6 % Gaps)
13,3 mg i.p. 40 mg i.p. 120 mg i.p.	6,4 27,8 17,0	8,0 34,8 63,2	24	

Obwohl VICTOR die Substanz fünfmalig im Abstand von 24 Std. verabreichte, um den Langzeiteffekt von 40 mg/kg Cyclophosphamid zu studieren, erreichte er nahezu dieselben Ergebnisse, vor allem auch eine ähnlich gute Korrelation beider Methoden. Bemerkenswert ist, daß VICTOR aus technischen und experimentellen Gründen (er führte auch die Spermatogonien-Methode durch) Chromosomenanalyse und Mikrokerntest jeweils getrennt einsetzte und deshalb auf eine Colchicin-Applikation im Mikrokerntest verzichten konnte. Abgesehen davon, daß sich VICTORs 40 mg-Wert mit 20,6 °/oo kaum vom eigenen 40 mg-Wert mit 20,4 °/oo unterscheidet, sind auch seine Kontrollwerte trotz Verzicht auf Colchicin in derselben Größenordnung wie die eigenen Kontrollwerte (mit Colchicin):

Erythrozyten	VICTOR	eigene Werte
polychromatische	4,5 °/oo	2,3 °/oo
normochromatische	2,16 °/oo	3,0 °/oo

Außerhalb der in der Tabelle genannten Veröffentlichungen ist noch die Arbeit von GOETZ und ŠRAM (1975) zu erwähnen, in welcher mit ähnlichen Dosen Cyclophosphamid eine ebenfalls gute Korrelation beider Methoden erzielt wurde; Originalwerte waren leider nicht erhältlich.

d) Zusammenfassung

Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest stimmen grob überein. Kleinere Differenzen, wie der schnellere Anstieg der Aberrationsrate gegenüber der Mikrokernrate nach 12stündiger Aufarbeitungszeit oder das weniger starke Zurückbleiben des 120 mg-Wertes nach 24-stündiger Aufarbeitungszeit im Mikrokerntest gegenüber der Chromosomenanalyse konnten registriert und teilweise interpretiert werden (vgl. Kap. VI, 3.). Die gute Übereinstimmung der Aberrationsrate nach 12stündiger Aufarbeitungszeit

mit der Mikrokernrate nach 24stündiger Aufarbeitungszeit bestätigte die Erwartung, daß der Zeitraum einer weiteren Mitose, also 12 bis 14 Stunden, abgewartet werden muß, wenn eine der Aberrationsrate tatsächlich vergleichbare Mikrokernrate resultieren soll. Die jeweils pro Tier erhaltenen Einzelergebnisse zeigten divergierende Befunde für Chromosomenanalyse und Mikrokerntest. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Cyclophosphamid konnten ebensowenig wie in der Literatur ausfindig gemacht werden. Aus dem Dosis-Wirkungs-Verhalten in der Chromosomenanalyse und aus Zellverschiebungen im Mikrokerntest konnte eine Knochenmarkdepression nach 120 mg/kg Cyclophosphamid bzw. 24stündigem Aufarbeitungsintervall abgeleitet werden, wobei für beide Methoden unterschiedliche Mechanismen wahrscheinlich gemacht wurden. Der Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen, die andere Autoren mit Cyclophosphamid erzielten, offenbarte besonders gute Übereinstimmungen zwischen MÜLLER u. Mitarb. (1972), VICTOR (1978), GOETZ und ŠRAM (1975) einerseits und den eigenen Befunden andererseits.

2. Unterschiede zwischen Chromosomenanalyse und Mikrokerntest

a) Informationsunterschiede

Schon in der Einleitung wurde angedeutet, daß mit der Chromosomenanalyse des Knochenmarks eine größere Fülle von Informationen erhältlich ist als mit dem Mikrokerntest. So können mit der Chromosomenanalyse Art, relative Häufigkeit und Tendenz der durch die Testsubstanz induzierten Mutationen festgestellt und statistisch gesichert werden, wie es in der vorliegenden Arbeit geschah, wo Pulverisationen, Gaps, Brüche und Exchanges gesondert registriert wurden. Wenn BOLLER und SCHMID (1970) im Rahmen des noch nicht standardisierten Mikrokerntests verschiedene Mikrokerntypen registrierten und

versuchten, diese den verschiedenen Aberrationstypen zuzuordnen, so konnte dies - wie sie selbst zugeben - nicht viel mehr als eine vorsichtige Spekulation sein. Sie differenzierten in fragmentierte, strukturlose Kerne als Abkömmlinge pulverisierter Metaphasen, Leukozytenkörperchen und vorzeitige Mikrokerne als Abkömmlinge der Mitosen mit wenigen Chromosomenaberrationen und Mikrokerne anderer Art als Nachfahren multipel aberranter Mitosen. Eine solche Differenzierung ist - abgesehen von der grundsätzlichen Fragwürdigkeit solcher Spekulationen - im standardisierten Mikrokerntest ohnehin nicht mehr möglich.

Neben der eher statischen Momentaufnahme, in welcher Art und relative Häufigkeit der strukturellen Chromosomenaberrationen zum Aufarbeitungstermin festgehalten werden, läßt die Differenzierung in der Chromosomenanalyse auch die Erschließung dynamischer Gesichtspunkte hinsichtlich gewisser Tendenzen zu. Ein Beispiel dafür ist die statistische Weiterverarbeitung des Datenmaterials der Chromosomenanalyse in der folgenden Trendanalyse. Im PFANZAGL-Trendtest wurde versucht, die Tendenz zu einem stärkeren Anwachsen höherwertiger Aberrationstypen (Brüche und Exchanges) an den Gesamtaberrationsraten parallel zu steigenden Dosen Cyclophosphamid statistisch zu sichern. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht in einem parametrischen Verfahren geschehen, da die Zahlen der Chromosomenanalyse dafür zu klein und außerdem nur drei Stützpunkte (nur drei Dosierungen) vorhanden waren. Ein typenspezifisches Antwortverhalten in Gestalt linearer oder exponentieller Dosis-Wirkungs-Beziehungen einzelner Aberrationstypen kam also von den Voraussetzungen her nicht in Frage. Im PFANZAGL-Trendtest wurden normale Metaphasen sowie die Aberrationstypen in wertige "Aberrationsstufen" von 1 bis 4 umgewandelt und die Tendenz zur stärkeren Repräsentation höherwertiger "Aberrationsstufen" bei höheren Dosen

Cyclophosphamid paarweise (13,3 und 40 mg; 40 und 120 mg; 13,3 und 120 mg) ermittelt. Pulverisationen wurden dabei entgegen der Anordnung bei der Vorstellung der Daten (Kap. V.1.) in Stufe 3, d.h. der zweitschwersten Schädigungsklasse, eingeordnet. Die entsprechenden Kontingenztafeln und t-Werte wurden tabellarisch in den Tabellen 14, 15 und 16 aufgetragen. Wie aus diesen ersichtlich ist, liegen alle t-Werte signifikant unter der 0,005 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. mit $t = 6,078$, $t = 6,303$ und $t = 11,976$ weit über dem 0,005-Quantil mit $u_p = 3,2905$. Die erwartete Tendenz der Brüche und Exchanges, nach Gabe von 40 und 120 mg/kg Cyclophosphamid relativ stärkere Anteile an den Gesamtaberrationsraten zu stellen als nach Gabe von 0 und 13,3 mg/kg, ließ sich also statistisch erhärten.

Es leuchtet ein, daß mit einer solchen dynamischen Betrachtungsweise ein weiterer Informationsvorsprung der Chromosomenanalyse vor dem Mikrokerntest einhergeht. Schließlich steht mit der Kenntnis von Art, relativer Häufigkeit und Tendenz der Aberrationen auch ein ungefähres Maß für stabile und folgenschwere Aberrationen zur Verfügung, die ausschließlich unter den Exchanges zu finden sind. Diese führen nicht zum baldigen Tod der Zelle, sondern sind oft mit Informationsänderungen verbunden und können für das Individuum schwerwiegende Folgen haben. Nach CARRANO u. Mitarbeitern (1975) zählen zu diesen stabilen Aberrationen, die die Gefahr von Klonbildungen und Selektionsphänomenen mit sich bringen, reziproke Translokationen und Inversionen. Das Schicksal der (damit ebenfalls abschätzbaren) unstabilen Aberrationen wie der nichtreziproken Translokationen, dizentrischen Chromosomen oder azentrischen Fragmente ist dagegen mit dem baldigen Tod der Zelle besiegelt: gemäß CARRANO und HEDDLE (1973) sterben zunächst die Zellen mit dizentrischen Chromosomen infolge

Tabellen 14,15,16: PFANZAGL-Trendtest zur Objektivierung unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Verhaltens der einzelnen Aberrationsklassen in der Chromosomenanalyse, dargestellt mit den Werten des 12 Std.-Intervalls. Paarweise Gegenüberstellung zweier Dosen zur Errechnung der unterschiedlichen Trends. Zahlen: absolute Anzahl der Metaphasen pro Dosis. 1-4 = Schweregrade der mutagenen Veränderungen
0,005 %ige Irrtumswahrscheinlichkeit bei $u_p = 3,2905$
Alle Ergebnisse (t) weit über 3,2905

Tab.14: Trend 40 mg → 120 mg. Ergebnis: t = 6,078

	1 Keine Aberration	2 Gaps	3 Brüche u. Pulverisationen	4 Exchanges	Summe
40 mg	336	33	52	79	500
120 mg	244	44	62	150	500
Summe	580	77	114	229	1000

Tab.15: Trend 13,3 mg → 40 mg. Ergebnis: t = 6,303

	1 Keine Aberration	2 Gaps	3 Brüche u. Pulverisationen	4 Exchanges	Summe
13,3 mg	403	40	38	19	500
40 mg	336	33	52	79	500
Summe	739	73	90	98	1000

Tab.16: Trend 13,3 mg → 120 mg. Ergebnis: t = 11,976

	1 Keine Aberration	2 Gaps	3 Brüche u. Pulverisationen	4 Exchanges	Summe
13,3 mg	403	40	38	19	500
120 mg	244	44	62	150	500
Summe	647	84	100	169	1000

Brückenbildungen in der Anaphase ab. Danach sollen jene Zellen mit echten Deletionen in dem Maße nachfolgen, in welchem ihr intrazellulärer Vorrat an entsprechenden Genprodukten aufgebraucht ist.

Die aufgrund der hier gewählten Versuchsanordnung nicht durchgeführte, aber mögliche Unterscheidung in Aberrationen vom Chromosomentyp (CSTA) und Aberrationen vom Chromatidtyp (CTTA) ist nach SCHLEIERMACHER (1971) außerdem geeignet, den Anteil der stabilen bzw. unstabilen Aberrationen in der Gruppe der Exchanges grob zu überschlagen: unter den Chromatidtypaberrationen sollen mehr unstabile, unter den Chromosomentypaberrationen dagegen mehr stabile Aberrationen aufzufinden sein.

Alle Informationen dieser Art sind aus dem Mikrokerntest nicht zu gewinnen. Nach SCHROEDER (1970) können Gaps, reversible Brüche, einfache Translokationen und symmetrische Austauschfiguren überhaupt nicht zu Mikrokernen führen; ihre Existenz bleibt daher im Mikrokerntest vollkommen unerkannt. Bei Gaps, deren Bedeutung und Dosisabhängigkeit immer noch umstritten ist (vgl. SCHEID und TRAUT, 1970 und 1971; GEBHART, 1971), wäre dies als Informationsverlust zwar nicht sehr bedauerlich. Die trotz Anwendung des Mikrokerntests unvermeidliche Unkenntnis über die Zahl der stabilen Aberrationen dürfte jedoch einigermaßen schwer wiegen. Die Reduzierung der Beobachtungskriterien in der Begutachtung von Knochemarkausstrichen, die bei der Standardisierung des Mikrokerntests durch SCHMID (1975 a und b) vorgenommen wurde, brachte darüber hinaus ebenfalls einen Informationsverlust mit sich: Mikrokerne in Erythroblasten, Leukozytenvorstufen und Leukozyten, pathologisch fragmentierte Kerne, pseudopodienartige Cytoplasmafortsätze, Kernvakuolen, Riesenzellen und Zellen mit Endomitosen, die BOLLER und SCHMID (1970) und zum Teil auch MÜLLER u.Mitarb. (1972) noch

auswerteten, verschwanden - teilweise allerdings zu Recht- aus der Liste der Beobachtungskriterien, so daß der Mikrokerntest auch die auf cytologischer Ebene liegenden Informationsmöglichkeiten nicht voll ausnutzt. Ein Maximum dessen, was der Test dabei an Empfindlichkeit verlieren kann, ist in der Arbeit von MÜLLER, LANGAUER u. Mitarb. (1972) zu finden (vgl. Tab. 13): die 128 mg-/18 Std.-Rate an mikrokernhaltigen poly- und normochromatischen Erythrozyten beträgt dort etwa 70 °/oo, während die Rate nach Berücksichtigung aller Kernanomalien etwa 140 °/oo, d.h. das Doppelte, ausmacht.

b) Auswirkung von Spindelstörungen

Das Übergangsfeld von rein qualitativen Informationsunterschieden zu quantitativen (in Dosis-Effekt-Beziehungen objektivierbaren) Empfindlichkeitsunterschieden, das beim letzten Zitat schon anklang, ist auch das unterschiedliche Ansprechen der beiden Methoden auf Spindelstörungen einzuordnen.

SCHMID (1973) stellt das direkte Erfassen von Spindelstörungen als wesentlichen Vorteil des Mikrokerntests hin. Ohne Zweifel führen Spindelstörungen dazu, daß ganze Chromosomen während der Anaphase in der Metaphasenebene liegenbleiben (anaphase lagging) und anschließend Mikrokerne bilden, die die Höhe der Mikrokernrate unmittelbar beeinflussen. Jedoch kann wegen der fehlenden Differenzierungsmöglichkeit der Ergebnisse des Mikrokerntests nicht abgeschätzt werden, ob ausschließlich Chromosomenaberrationen oder auch Spindelstörungen bzw. ausschließlich Spindelstörungen wie nach Gabe von Methylbenzimidazolylcarbamat (MBC; vgl. Kap. II, 2.) für die Höhe der Mikrokernrate verantwortlich zu machen sind. Wenn die Chromosomenanalyse auch nicht die Methode der Wahl für das

Erfassen der Spindelstörungen ist, da sie mit ihrer Präparationstechnik viele Artefakte setzt (Suspensionsmethode), so ist mit ihr wenigstens die begriffliche Unterscheidung zwischen numerischen und strukturellen Aberrationen möglich.

Die Frage, in welchem Maß Colchicin als Spindelgift bei den eigenen Versuchen Spindelstörungen mit verursacht haben könnte, muß in diesem Zusammenhang erörtert werden.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, daß die Wirkung selbst so ausgesprochener Spindelgifte wie Colchicin auf die Mikrokernraten nicht mit der zuweilen verheerenden Wirkung chromosomenbrechender Substanzen zu vergleichen ist. MATTER u. Mitarb. (1974) fanden, daß die niedrigste Dosis Colchicin, die - an Mäusen getestet - eben noch Mikrokerne erzeugte, in der Größenordnung von 1 - 2 mg/kg lag, wonach sie 9,8 °/oo mikrokernhaltige Erythrozyten (poly- und normochromatische) erhielten. Nach Gabe von 2,5 mg/kg ermittelten sie 12,0 °/oo und nach 5,0 mg/kg immerhin 19,6 °/oo mikrokernhaltige Erythrozyten. SEILER (1976) erhielt nach 50 mg/kg des Spindelgifts MBC 4,2 °/oo, nach 500 mg/kg 19,7 °/oo und nach 1000 mg/kg 26,8 °/oo mikrokernhaltige Erythrozyten, während beispielsweise die Gabe von 120 mg/kg Cyclophosphamid in den eigenen Versuchen 92,8°/oo mikrokernhaltige polychromatische Erythrozyten hervorrief.

Bei Colchicin spielt die Zeit zwischen Applikation und Aufarbeitung der Tiere natürlich die gleiche Rolle wie auch bei anderen Substanzen. Wird erst kurz vor der Aufarbeitung, d.h. 2 bis 4 Std. vorher, appliziert, so ruft Colchicin eine im Verhältnis ebenso geringe Dosisantwort hervor, wie es bei chromosomenbrechenden Substanzen, die lediglich 2 bis 4 Std. vorher appliziert werden, auch der Fall wäre. So fand MILLER (1973), der 4 Std. vor der Aufarbeitung 0,4 mg/kg Colchicin applizierte, tatsächlich nur eine geringfügige Erhöhung der Mikrokernrate in polychromatischen Erythrozyten

von 2,1 °/oo in der Kontrolle auf 3,9 °/oo. Ebenso gering war die mikrokern-erhöhende Wirkung einer zusätzlichen Colchicingabe bei Mitomycin-C-Behandlung, die MILLER durchführte: lediglich nach einem Aufarbeitungsintervall von 24 Std. erhöhte sich die Mikrokernrate durch Colchicin von 10,2 °/oo auf 11,4 °/oo. Nach 48 Std. sank sie (aus anderen Gründen) von 34,3 °/oo auf 7,2 °/oo ab. Auf die gute Übereinstimmung der eigenen 40 mg-Werte (mit Colchicin) in Höhe von 20,4 °/oo mit den 40 mg-Werten von VICTOR (1978; ohne Colchicin) in Höhe von 20,6 °/oo wurde bereits in Kap. VI, 1.c hingewiesen.

Die mikrokernerzeugende Wirkung von Colchicin in den eigenen Experimenten (Colchicin wurde nur 2 Std. vor der Aufarbeitung appliziert) dürfte demnach fast ganz zu vernachlässigen sein. Ein Rückblick auf die Tab. 1 und 2 (Kap. II, 3. und 4.) macht schnell deutlich, daß innerhalb 2 Stunden wohl kaum Mikrokerne in Zellen entstehen konnten,die für die Auswertung in Frage kommen: Die Generationszeit eines Zellzyklus bei Erythropoese-Zellen des Chinesischen Hamsters liegt immerhin zwischen 12 und 14 Stunden. Um ganz sicher zu gehen, d.h. den Colchicin-Effekt wirklich auf ein Minimum zu beschränken, wurde in den eigenen Experimenten jeweils nur 3,3 mg/kg Colchicin injiziert, während für die Arretierung der Metaphasen sonst 6 bis 10 mg/kg Colchicin verabreicht werden. Dabei erwiesen sich 3,3 mg/kg als akzeptabler Kompromiß, da einerseits die Substanzmenge für die Zwecke der Chromosomenanalyse ausreichte und andererseits die durch Cyclophosphymid gesetzte, hohe Mikrokernrate mit Sicherheit nicht um wesentliche Beiträge heraufgesetzt werden konnte.

Abschließend sei zusammengefaßt, daß die Bedeutung des von SCHMID (1973) genannten Vorteils des direkten

Miterfassens von Spindelstörungen im Mikrokerntest zwar gewürdigt, aber nicht überschätzt werden darf, weil der Anteil jener Zellen, die allein aufgrund von Spindelstörungen Mikrokerne enthalten, innerhalb der Mikrokernrate nicht zu bestimmen ist und der Anteil dieser Zellen laut Literaturangaben ohnehin vergleichsweise gering ist.

c) Empfindlichkeitsunterschiede

Trotz der erwähnten Informationsnachteile und der Tatsache, daß dem direkten Miterfassen von Spindelstörungen im Mikrokerntest nur geringe Bedeutung beizumessen ist, kann man die Ergebnisse von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest als ebenbürtig ansehen. Eine Erklärung für die überraschend gute Empfindlichkeit des Mikrokerntests ist dabei in der hervorragenden statistischen Verfügbarkeit der mit ihm erhobenen Daten zu suchen. Wie schon SCHMID (1972) darlegte, ist die Kontrollrate der Mikrokerne in konstanter Weise gering. Sie beträgt normalerweise 3 bis 5 °/oo und nahm - um Beispiele zu nennen - bei MATTER und GRAUWILER (1974) Werte zwischen 0 und 2,5 °/oo an, betrug bei WEBER u. Mitarb. (1975) 4,3 °/oo der polychromatischen Erythrozyten und belief sich in den eigenen Versuchen auf 2,3 °/oo der poly- und 3,0 °/oo der normochromatischen Erythrozyten. Die Folge dieser konstant niedrigen Kontrollraten ist ein relativ hoher Gradient zwischen Kontroll- und Behandlungswerten. In der vorliegenden Arbeit war dies in den Abbildungen 21 und 22, in denen alle Werte relativ zur Kontrolle aufgetragen sind, besonders klar zu sehen.

Neben den niedrigen Kontrollraten trägt zu der guten statistischen Verfügbarkeit der Daten im Mikrokerntest auch die Tatsache bei, daß pro Dosis und Intervall mit Leichtigkeit beträchtliches Zahlenmaterial zusammengetragen werden kann. Die Auswertung von 1000 oder 2000

Erythrozyten pro Einzeltier ist dabei kein Problem, so daß je Behandlungsgruppe leicht 5000 bis 10.000 Erythrozyten ausgewertet werden können, wie es beispielsweise in der vorliegenden Arbeit geschah. Dies wiederum wirkt sich recht vorteilhaft auf die Signifikanzwerte und Irrtumswahrscheinlichkeiten im χ^2-Test aus. Der in dieser Arbeit auf den ersten Blick nicht gerade auffällige Anstieg der Mikrokernrate bei 13,3 mg/kg und 12 Std. Aufarbeitungszeit auf 7,2 °/oo besaß auf diese Weise eine Irrtumswahrscheinlichkeit von lediglich p = 0,0002. Eine ähnlich niedrige Irrtumswahrscheinlichkeit wäre unter vergleichbaren Bedingungen in der Chromosomenanalyse nicht möglich gewesen.

Es ist sicher, daß neben den genannten Gründen freilich auch das unmittelbare Miterfassen von Spindelstörungen die Mikrokernrate, d.h. letzten Endes auch die Empfindlichkeit des Mikrokerntests, um geringe Beträge heraufsetzen kann. Dies ist im Hinblick auf entsprechende Störungen in Keimzellen, die durch das mutagene Agens induziert werden können, theoretisch zu bedenken. Eine drastische Steigerung der Empfindlichkeit des Tests ist jedoch aus bereits dargelegten Gründen nicht möglich.

d) Differentialdiagnostische Schwierigkeiten/ Zeitaufwand

In Chromosomenanalyse wie Mikrokerntest treten jeweils unterschiedliche differentialdiagnostische Schwierigkeiten auf, die wert sind, etwas näher erläutert zu werden.

In der Chromosomenanalyse sind dies hauptsächlich: die Unterscheidung zwischen Gaps und Sekundärkonstriktionen, die besonders bei schwachem Spiralisierungsgrad der Chromosomen getroffen werden muß, die bereits in Kap. IV, 4.b ausführlich erörterte Differentialdiagnose zwischen Gaps und Brüchen und die generelle Frage, ob überhaupt eine

Aberration vorliegt oder ob nicht vielmehr ein Artefakt eine solche vortäuscht. Daß viele dieser Entscheidungen die Einordnung einer Metaphase in die eine oder andere Aberrationsklasse und insofern auch die Gesamtaberrationszahlen (incl. und excl. Gaps) beeinflussen, liegt auf der Hand.

Wird der Mikrokerntest bei stark mutagenen Substanzen angewandt, bei denen Knochenmarkdepressionen, diffuse Blutungen und Einschwemmungen peripherer Erythrozyten die getrennte Registrierung polychromatischer und normochromatischer Erythrocyten erfordern, gibt es auch dort Unterscheidungsschwierigkeiten. Sie betreffen die Fragen, ob mikrokernhaltige Zellen der einen oder der anderen Erythrozytenart (poly- oder normochromatische Erythrozyten) zugesprochen werden sollen, bzw. ob Mikrokerne oder mikrokernähnliche Gebilde vorliegen, eine Unterscheidung, die MATTER und GRAUWILER (1974) als "the most critical and crucial part of the micronucleus procedure" bezeichnen. Unter den mikrokernähnlichen Gebilden (vgl. Kap. IV,5.b) sind die basophilen Zellbestandteile als Austrocknungsartefakte am häufigsten und am schwersten von den Mikrokernen zu unterscheiden.

Differentialdiagnostische Schwierigkeiten treten im Mikrokerntest weniger massiv auf als in der Chromosomenanalyse. Der hohe Schwierigkeitsgrad der Chromosomenanalyse ist in erster Linie auf diese Schwierigkeiten zurückzuführen.

Auch der Zeitaufwand, der mit Chromosomenanalyse bzw. Mikrokerntest verbunden ist, fällt zugunsten des Mikrokerntests aus; er ist bei der Chromosomenanalyse 2 bis 3 mal größer als beim Mikrokerntest. Da innerhalb des Mikrokerntests - wie oben schon angedeutet - 5000 bis 10.000 Erythrozyten pro Behandlungsgruppe mit mehr oder minder großer Leichtigkeit ausgewertet werden können, ist es mit ihm eher möglich, eine Testsubstanz in relativ kurzer Zeit auf Mutagenität zu testen.

e) Interspeciesvergleiche

In der Literatur wird des öfteren darauf hingewiesen, daß der Mikrokerntest für Interspeciesvergleiche viel geeigneter sei als die Chromosomenanalyse, da man mit ihm die Ergebnisse der jeweiligen Tierspecies ohne Rücksicht auf den speziellen Karyotyp direkt miteinander vergleichen könne (MATTER und SCHMID, 1971; SCHMID, 1972 und 1973). Hierzu sind einige Bemerkungen angebracht:

Mikrokerne als Sekundärerscheinungen können nicht vollkommen lösgelöst von den ihnen zugrundeliegenden Chromosomenbrüchen als Primärereignissen gesehen werden. Im gleichen Maß, wie (im Sinne der Treffertheorie) die Chromosomenzahl des jeweiligen Genoms für die absolute Menge an Bruchereignissen je Metaphase mitverantwortlich ist - BREWEN und PRESTON (1974) fanden z.B. eine direkte Abhängigkeit der Anzahl dizentrischer Chromosomen von der Anzahl der Chromosomenarme pro Metaphase - , ist auch die Mikrokernmenge sicherlich von der Anzahl der Chromosomen der jeweiligen Species, d.h. vom Karyotyp, abhängig. Zwar dürfte diese Abhängigkeit nicht streng korrelativ sein, immerhin aber gibt es z.T. unerwartete Abweichungen, die auf andere Art und Weise nicht interpretiert werden können. So fanden MATTER und SCHMID (1971) beim Vergleich von Maus, Ratte, Syrischem Hamster, Meerschweinchen und Chinesischem Hamster speziell beim Syrischen Hamster abweichende Mikrokern-Ergebnisse. Schließlich muß auch berücksichtigt werden, daß bei einzelnen Species differentialdiagnostische Schwierigkeiten hinzutreten können. Bei der Ratte beispielsweise sind dies die basophilen Granula geborstener Leukozytenvorstufen, die in den Ausstrichpräparaten Mikrokerne vortäuschen und damit die Ergebnisse in spezifischer Weise verfälschen (VON LEDEBUR und SCHMID, 1973; SCHMID, 1973 und 1975; MILLER, 1973). In Anbetracht der Tatsache, daß Mikrokernergebnisse also

doch etwas von der jeweiligen Species abhängig sind, sind auch die Ergebnisse von Chromosomenanalysen verschiedener Species kaum weniger gut miteinander vergleichbar. - Abgesehen davon darf auch der Hinweis, Mikrokernergebnisse von Laboratoriumssäugern und vom Menschen seien besser vergleichbar, nicht überbewertet werden, da die praktische Bedeutung dieser Feststellung sehr gering ist: Mutationsexperimente am Menschen werden aus ethischen Gründen nicht durchgeführt, und im Falle unfreiwilliger Exposition des Menschen gegenüber mutagenen Substanzen werden wohl immer die Laboratoriumssäuger als Vergleichsspecies wegen der Zufälligkeit des Geschehens fehlen.

f) Zusammenfassung

Die Chromosomenanalyse des Knochenmarks bietet gegenüber dem Mikrokerntest erhebliche Informationsvorteile, da mit ihr eine Differenzierung der Gesamtergebnisse in Art, relative Häufigkeit und dosisabhängige Tendenz der Aberrationen sowie die Unterscheidung zwischen strukturellen und numerischen Aberrationen möglich ist. Die statistische Verwertbarkeit der differenzierten Ergebnisse in parametrischen Verfahren oder Trendanalysen (wie hier im PFANZAGL-Trendtest) stellt ebenso wie die prognostisch wichtige Unterscheidung stabiler und unstabiler Aberrationen eine weitere Informationsmöglichkeit dar.

Eine Unterscheidung polychromatischer und normochromatischer mikrokernhaltiger Erythrozyten im Mikrokerntest wird nur bei starken Mutagenen durchgeführt, was eine Abwehrmaßnahme zur Verhütung falsch negativer oder zu niedriger Ergebnisse im Falle von Knochenmarkdepressionen darstellt, ansonsten aber keinerlei vergleichbare Effizienz (gegenüber der Differenzierung der Aberrationsrate in der Chromosomenanalyse) mit sich bringt. Aus zahlenmäßigen Verschiebungen von polychromatischen und normochromatischen Erythrozyten können

eventuell vorhandene Knochenmarkdepressionen allerdings unmittelbar abgeleitet werden, was mit der Chromosomenanalyse nicht möglich ist.

Neben der Unmöglichkeit, die Mikrokernraten in ähnlicher Weise wie die Chromosomenaberrationsraten zu differenzieren, wurde folgendes als Informationsverlust bezeichnet: das Nichterfassen von Gaps, reversiblen Brüchen, einfachen Translokationen und symmetrischen Austauschfiguren sowie der Verzicht auf die Auswertung von Kernfragmenten und - vakuolen, Riesenzellen und Endomitosen sowie Mikrokernen in Leukozyten, Leukozytenvorstufen und Erythroblasten. Außerdem muß die Tatsache, daß nur im Mikrokerntest ein unmittelbares Miterfassen von Spindelstörungen möglich ist, aus verschiedenen Gründen als weniger bedeutsam hingestellt werden.

Konstant niedrige Kontrollraten und vergleichsweise leicht zu gewinnende, große Zahlen wurden einschließlich der Konsequenzen, die sich daraus für die statistische Sicherung der Daten ergeben, als Vorteil des Mikrokerntests hingestellt. Der Widerspruch zwischen dem Informationsnachteil und der mit der Chromosomenanalyse gleichzusetzenden Empfindlichkeit des Mikrokerntests konnte mit dieser Eigenschaft, der guten statistischen Verfügbarkeit der Daten, erklärt werden.

Infolge des unterschiedlichen Beobachtungsgutes von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest treten unterschiedliche differentialdiagnostische Schwierigkeiten auf, die auch hinsichtlich ihres quantitativen Auftretens bzw. ihrer Belastung für die Auswertung unterschiedlich zu beurteilen sind. Neben der Tatsache, daß diese Schwierigkeiten in der Chromosomenanalyse größer sind als im Mikrokerntest, wurde auch die Tatsache diskutiert, daß der Zeitaufwand, der für die Chromosomenanalyse erforderlich ist, um das Zwei- bis Dreifache höher liegt als der für den Mikrokerntest.

Letztlich wurde hervorgehoben, daß entgegen einigen Angaben in der Literatur Interspeciesvergleiche mit dem Mikrokerntest nicht unabhängig vom Karyotyp der jeweiligen Species sind und daß Interspeciesvergleiche in annähernd gleichem Maße sowohl mit dem Mikrokerntest als auch mit der Chromosomenanalyse des Knochenmarks gut möglich sind.

3. Aussagekraft und Anwendbarkeit des Mikrokerntests

In der Einleitung wurde angedeutet, daß man die Brauchbarkeit von Methoden an den Kriterien der Validität und Reliabilität mißt. Eine erschöpfende Messung und Diskussion dieser Kriterien - wie auch der Objektivität oder der Normierung der besprochenen Methoden - konnte in diesem Rahmen nicht erfolgen. Es sei in Erinnerung gerufen, daß eine gewisse Standard-Version des Mikrokerntests (Durchführung, Auswertung) bereits von SCHMID (1975 a und b) ausgearbeitet wurde. Außerdem muß hervorgehoben werden, daß es die Chromosomenanalyse des Knochenmarks war, die überhaupt erst Gültigkeitsmaßstäbe für die Messung von Chromosomen- und Genommutationen zur Verfügung gestellt hat. Im übrigen sollen an dieser Stelle Validität und Reliabilität nicht als statistische Meßgrößen behandelt, sondern als brauchbare Begriffe in die Diskussion der oben zusammengetragenen Aspekte eingeführt werden.

Die Validität als Versicherung, der Test messe tatsächlich jene Merkmale, für deren Messung er geschaffen wurde (hier also Art, relative Häufigkeit und Tendenz aufgetretener Chromosomen- und Genommutationen), ist ohne Zweifel in der Chromosomenanalyse höher als im Mikrokerntest. Es sei erinnert an die Differenzierbarkeit in Aberrationstypen, die Möglichkeit einer Objektivierung dosisabhängiger Tendenzen innerhalb dieser Aberrationstypen, die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen numerischen und strukturellen Aberrationen sowie die prognostisch relevante

Differenzierungsmöglicheit in unstabile (für die Zelle meist letale) und stabile (für das Individuum gefährlichere) Aberrationen. Dementsprechend ist die Validität des Mikrokerntests geringer als die der Chromosomenanalyse. Der Grund dafür ist folgerichtig in dem Informationsdefizit gegenüber der Chromosomenanalyse zu suchen, welches mit der geringen Differenziertheit des Tests einhergeht und nicht zufällig mit der Tatsache zusammenfällt,daß mit dem Auszählen von Mikrokernen zwar mittelbare, cytologische Folgen von Primärdefekten im Erbmaterial, nicht aber diese selbst ermittelt werden können.

Da bei der Beurteilung von Methoden die Frage der Validität absoluten Vorrang vor den Fragen der Reliabilität oder der Normierung besitzt, kann die schwerwiegende Bedeutung einer geringeren Validität schließlich nicht mit dem Hinweis abgeschwächt werden, der Mikrokerntest besitze im Vergleich zur Chromosomenanalyse eine höhere Reliabilität. Es hat sich zwar gezeigt, daß der Mikrokerntest hervorragende statistische Eigenschaften besitzt, streng genommen ließen sich diese jedoch nicht auf chromosomale Aberrationen bzw. Chromosomen- und Genommutationen, sondern lediglich auf deren Nachfolgephänomene, die Mikrokerne, beziehen. Vernachlässigte man unter diesem Aspekt den Reliabilitätsvorteil und zöge man nur die Validität als stichhaltiges Kriterium zur Beurteilung des Tests heran, so gelangte man zu der Einsicht, daß der Mikrokerntest in sehr zuverlässiger Weise immer wieder nur Teile des letztlich Erforderlichen erfaßt, so wirkungsvoll seine Dosis-Effekt-Beziehungen auch aussehen mögen.

Indessen können dem Mikrokerntest nicht grundsätzlich Validität und Legitimation abgesprochen werden. Zunächst ist zu beachten, daß die Menge der ausschlaggebenden Informationsnachteile je nach Testsubstanz variieren kann:

bei schwachen Mutagenen und teilweise auch bei niedrigen Dosen starker Mutagene ist beispielsweise zu erwarten, daß der Anteil höherwertiger, im Mikrokerntest unentdeckt bleibender Aberrationen nicht so groß ist (vgl. PFANZAGL-Trendtest), daß folgenschwere Fehleinschätzungen der Mutagenität einer Substanz auftreten könnten. Sodann muß bezweifelt werden, ob angesichts der hier wie in der Literatur überraschend hohen Übereinstimmung der beiderseitigen Dosis-Effekt-Beziehungen die Validitätsfrage überhaupt jene schwerwiegende Bedeutung haben kann, die ihr zunächst beigemessen wurde.

Der Zweifel erscheint berechtigt. Obliegt es der routinemäßigen Mutagenitätstestung zunächst, mit größtmöglicher Empfindlichkeit erst einmal die Existenz mutagener Schäden ausfindig zu machen, so interessiert es vorläufig auch nur nebenbei, ob dafür direkte Verfahren wie die Chromosomenanalyse oder indirektere wie der Mikrokerntest herangezogen werden. Voraussetzung dafür ist freilich, daß die Effizienz der jeweiligen Dosis-Effekt-Beziehungen bzw. die Unmittelbarkeit der Reizbeantwortung mutagener Reize in beiden Verfahrensarten einigermaßen vergleichbar ist. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, scheint diese Voraussetzung bei Chromosomenanalyse und Mikrokerntest allerdings erfüllt zu sein. Somit muß auch dem Mikrokerntest ein Platz in der Mutagenitätstestung eingeräumt werden, ungeachtet der Tatsache, daß der Test im Vergleich zur Chromosomenanalyse eine geringere Validität besitzt und nicht differenziert genug ist, um für das sekundäre Ziel einer Spezifizierung der Ergebnisse eingesetzt zu werden.

Diese Feststellung darf indessen nicht zu dem Irrtum verleiten, die verbindliche Vortestung einer Substanz könne allein dem Mikrokerntest überlassen werden, während die weitere Differenzierung positiver Ergebnisse

dann arbeitsteilig der Chromosomenanalyse zufiele. Ist schon die Unterscheidung zwischen Primärziel (Erhebung von Dosis-Effekt-Beziehungen) und Sekundärziel (Spezifizierung eventuell vorhandener positiver Ergebnisse) künstlich und deshalb nicht wirklich vertretbar, so muß eine darauf aufbauende Arbeitsteilung zwischen den Methoden erst recht abgelehnt werden, zumal weitere Momente es verbieten, Mikrokerntest und Chromosomenanalyse überhaupt alternativ einzusetzen. Beide Methoden weisen nämlich - bei aller scheinbaren Gleichwertigkeit in dieser Arbeit - verschiedenartige systematische Fehler auf, die die Dosis-Effekt-Beziehungen an unterschiedlichen Orten so beeinflussen können, daß die applizierte Testsubstanz mit der einen Methode als genetisch unbedenklich, mit der anderen dagegen als mutagen, d.h. genetisch gefährlich, eingestuft werden muß.

Zu diesen systematischen Fehlern (vgl. differentialdiagnostische Schwierigkeiten, Kap. VI, 2.d), die durch zufällige Fehler von seiten des Untersuchers weiterhin verstärkt werden können, zählen im Mikrokerntest a) das teilweise massive Auftreten von Fehlentscheidungen, die dem Untersuchungsgut anzulasten sind und ihren Grund haben in der Isomorphie, die bei Mikrokernen und basophilen Zellbestandteilen des öfteren anzutreffen sind, oder den fließenden, nicht endgültig klassifizierbaren Übergängen zwischen poly- und normochromatischen Erythrozyten, b) das Nichterfassen stabiler Aberrationen, das besonders nach starker mutagener Schädigung zu Fehleinschätzungen führt, und c) das Nichterfassen reversibler Brüche und Gaps, das eher in unteren Dosisbereichen bedeutsam ist, wo minderwertige Aberrationstypen zahlenmäßig überwiegen (vgl. PFANZAGL-Trendtest). Der letztgenannte Fehler könnte dazu beitragen, daß die Mikrokernrate nach Gabe von 13,3 und 40 mg/kg Cyclophosphamid und 12stündigem Aufarbeitungsintervall

im skalaran Vergleich nur etwa die Hälfte dessen ausmachte, was die Chromosomenanalyse bereits ohne Gaps zu bieten hatte (vgl. Abb. 21 und Kap. VI, 1.d).

Demgegenüber bestehen die Fehler der Chromosomenanalyse a) darin, daß Auswirkungen von Spindelstörungen nicht exakt erfaßt und deshalb nicht in die Aberrationsraten integriert werden können (Suspensionsmethode), und b) darin, daß hier erhebliche, von der Qualität der Präparate stärker abhängige differentialdiagnostische Entscheidungsschwierigkeiten auftreten. Die typischen Schwierigkeiten seien an dieser Stelle noch einmal genannt: die Entscheidung, ob eine chromosomale Aberration vorliegt oder nur ein Präparationsartefakt , die Entscheidung zwischen Sekundärkonstriktionen und Gaps, die für die Gesamtaberrationsrate incl. Gaps bedeutsam ist, und schließlich die Entscheidung zwischen Gaps und Brüchen, die eher die Aberrationsrate excl. Gaps in ihrer Höhe beeinflussen dürfte. - In diesem Zusammenhang muß hinzugefügt werden, daß sich die Knochenmarkdepression in dieser Arbeit viel stärker auf das Dosis-Wirkungs-Gefüge der Chromosomenanalyse auswirkte als auf das des Mikrokerntests. Offensichtlich vermögen also auch unspezifische Faktoren in unterschiedlicher Weise die Dosis-Effekt-Beziehungen beider Methoden zu beeinflussen.

Aus allem ergeben sich hinsichtlich Anwendbarkeit und Aussagekraft des Mikrokerntests folgende Bewertungskonsequenzen (vgl. Tab. 17):

1. Der Mikrokerntest ist eine indirekte, im Vergleich zur Chromosomenanalyse technisch einfachere und zeitsparendere Methode zum Nachweis von Chromosomen- und Genommutationen im Knochenmark von Säugern.

2. Das Ausmaß der mit dem Mikrokerntest erhältlichen Informationen, die Differenziertheit des Tests und damit auch seine Validität sind geringer als die entsprechenden Parameter der Chromosomenanalyse.

3. Demgegenüber sind die statistische Verfügbarkeit und in gleichem Maße auch die Reliabilität des Mikrokerntests größer als die der Chromosomenanalyse.

4. Wie die vorliegende Arbeit bestätigte, liegt trotz aller Unterschiede zwischen Mikrokerntest und Chromosomenanalyse die Empfindlichkeit, d.h. die Effizienz der Dosis-Effektbeziehungen beider Methoden in derselben Größenordnung: die Korrelation zwischen beiden Methoden ist zufriedenstellend bis gut.

5. Die Aussagekraft des isoliert angewandten Mikrokerntests ist insgesamt geringer als die der isoliert angewandten Chromosomenanalyse, da mit dem Mikrokerntest eine differenzierte Betrachtung der Mutationen (Chromosomen- und Genommutationen) nicht möglich ist.

6. Die Feststellung, die Empfindlichkeit des Mikrokerntests liege in derselben Größenordnung wie die der Chromosomenanalyse, kann nicht uneingeschränkt gelten, da heterogene und heterotop auftretende systematische Fehler sowie unspezifische Einflüsse (z.B. Knochenmarkdepressionen) größere Unterschiede in den Dosis-Effekt-Beziehungen, ja sogar unterschiedliche Einschätzungen einer Testsubstanz hervorrufen können.

7. Trotz der hohen Übereinstimmung der beiderseitigen Ergebnisse in dieser Arbeit sollte die alternative Anwendung beider Tests bzw. der wechselseitige Austausch der Methoden unterbleiben. Dies gilt erst recht für den naheliegenden Versuch, den Mikrokerntest zur orientierenden Vortestung und die Chromosomenanalyse zur weiteren Differenzierung positiver Ergebnisse einzusetzen. Eine strenge Arbeitsteilung in diesem Sinne ist in der Praxis ohnehin nicht durchführbar.

8. Die alleinige Anwendung des Mikrokerntests für die Mutagenitätstestung einer Substanz scheint dabei wegen der geringeren Aussagekraft des Tests mit einem höheren Risiko belastet zu sein als die alleinige Anwendung der Chromosomenanalyse. Nur wenn die Chromosomenanalyse des Knochenmarks zusätzlich hinzugezogen wird, können die Vorteile des Mikrokerntests (relativ einfache Präparateherstellung, weniger massive differentialdiagnostische Schwierigkeiten, Zeitersparnis bei der Auswertung, niedrigere Kontrollraten, höhere Reliabilität und weniger schwerwiegende systematische Fehler) mit gutem Gewissen genutzt werden.

9. Als günstiger Weg zu einer sicheren Beurteilung von Chromosomen- und Genommutationen im Knochenmark von Säugern bietet sich die simultane Anwendung beider Methoden an. Wie die vorliegende Arbeit zeigte, können Chromosomenanalyse und Mikrokerntest ohne weiteres gleichzeitig an einem Tier durchgeführt werden. Befürchtungen, das Zahlenmaterial reiche nicht für beide Methoden aus oder die Applikation von Colchicin verfälsche die Mikrokernrate, sind nicht angezeigt.

10. Gegenüber einer isolierten Anwendung beider Methoden oder gar der Anwendung nur einer der beiden Methoden bietet die simultane Durchführung von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest folgende Vorteile:

    Falsch positive oder falsch negative Zufallsergebnisse des einen Tests können mit dem anderen Test mit größerer Zuverlässigkeit aufgedeckt werden, wobei die größere Zuverlässigkeit bei einer solchen Versuchsanordnung darauf beruht, daß interindividuelle Schwankungen der Resorption, Verteilung, Metabolisierung oder Eliminierung einer Testsubstanz nicht mehr stören und damit auch nicht mehr zur Erklärung unterschiedlicher Dosis-Wirkungs-Beziehungen in

Chromosomenanalyse und Mikrokerntest herangezogen werden können. Es scheint so, als ob mit der simultanen Anwendung beider Methoden auch die statistische Sicherung schwach mutagener Effekte erleichtert wäre: sie könnte mit dem umfangreichen Zahlenmaterial des Mikrokerntests en passant durchgeführt werden, so daß sich im gleichen Moment eine zeitraubende Erweiterung der Experimente, wie sie mit der Chromosomenanalyse zum selben Zweck nötig wäre, erübrigte. Allgemein gesehen kann mit der gleichzeitigen Anwendung von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest die Entscheidung über die genetische Unbedenklichkeit einer Substanz oder deren Bedenklichkeit, d.h. Mutagenität, leichter getroffen und insgesamt die Sicherheit in der Beurteilung der Chromosomen- und Genommutationen weitgehend erhöht werden.

Tab.17 Bewertende Gegenüberstellung von Chromosomenanalyse und Mikrokerntest

++ sehr vorteilhaft (-) weniger vorteilhaft
+ vorteilhaft - unvorteilhaft
(+) annehmbar

	Chromosomenanalyse		Mikrokerntest	
Technik	-	anspruchsvoll	+	weniger anspruchsvoll
Differentialdiagn. Entscheidungen	-	z.B.Sekundärkonstriktionen/Gaps Gaps/Brüche etc.	(+)	z.B.basophile Zellbestandteile/Mikrokerne. Poly-/normochromatische Erythr.
Auswertung	-	aufwendig	+	rasch
Informationsfülle	+	Art,relative Häufigkeit u.Tendenz der Aberrationen. strukt./numer.Ab.	-	Mikrokernrate undifferenzierbar
Differenziertheit	+		-	
Validität	+	höher	-	niedriger
Statistische Verfügbarkeit	-	höhere Kontrollraten	+	niedrigere Kontrollraten
Reliabilität	-	niedriger	+	höher
Systematische Fehler	(-)	vgl.Text	(+)	vgl.Text
Empfindlichkeit (Dosis-Effekt-Beziehungen	+	in Chromosomenanalyse und Mikrokerntest gleich, punktuelle Unterschiede	+	vgl. Chromosomenanalyse
Aussagekraft (isoliert)	+	wegen höherer Validität	(+)	wegen geringerer Validität
Anwendbarkeit (isoliert)	(+)	infolge zufriedenstellender Aussagekraft vertretbar	(-)	als alleiniger screening-Test weniger gut vertretbar
Anwendbarkeit (simultan)	++	geringe Reliabilität wird durch den Mikrokerntest kompensiert (vgl.Text)	++	geringe Validität wird durch die Chromosomenanalyse kompensiert (vgl.Text)

VII. Zusammenfassung

Im Sinne einer eingehenden Untersuchung des von SCHMID (1975 a und b) für die Routinetestung mutagener Substanzen ausgearbeiteten Mikrokerntests wurde geklärt, inwieweit die Auszählung von Mikrokernen in jungen Knochenmark-Erythrozyten im Mikrokerntest eine ebenso hohe Empfindlichkeit und Aussagekraft für die Zwecke einer Mutagenitätstestung mit sich bringt wie die Analyse chromosomaler Aberrationen im Rahmen der Chromosomenanalyse des Knochenmarks.

Chinesische Hamster (Cricetulus griseus) wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit verschiedenen Dosen (13,3, 40 und 120 mg/kg) Cyclophosphamid behandelt. 12 bzw. 24 Std. nach der letzten Applikation der Substanz wurden vom Knochenmark der Tiere gleichzeitig Präparate für den Mikrokerntest (Methode nach SCHMID, 1975 a u.b) wie für die Chromosomenanalyse (Methode nach SCHMID und STAIGER, 1969) angefertigt. Die resultierenden Dosis-Effekt-Beziehungen sowie andere, für die Fragestellung relevante Kriterien wurden zur Klärung herangezogen.

Die Untersuchung ergab neben den grob übereinstimmenden Dosis-Effekt-Beziehungen beider Methoden Unterschiede hinsichtlich der Informationsfülle, Differenziertheit und Validität, die zugunsten der Chromosomenanalyse ausfielen, hinsichtlich der statistischen Verfügbarkeit der Daten und der Reliabilität, die zugunsten des Mikrokerntests ausfielen, sowie Unterschiede in Technik (Mikrokerntest leichter), Auswertung (differentialdiagnostische Schwierigkeiten im Mikrokerntest weniger ausgeprägt) und Auftreten systematischer Fehler, welche die Dosis-Effekt-Beziehungen an jeweils anderen Orten störten.

Bei der geringeren Validität und der höheren Reliabilität konnte die Empfindlichkeit des Mikrokerntests, gemessen an der Effizienz seiner Dosis-Wirkungs-Beziehungen, als ebenso hoch bezeichnet werden wie die Empfindlichkeit der Chromosomenanalyse. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Aussagekraft des isoliert angewandten Mikrokerntests für eine Entscheidung über die genetische Bedenklichkeit bzw. Unbedenklichkeit einer Testsubstanz weniger groß ist als die Aussagekraft der Chromosomenanalyse, da der Mikrokerntest neben den systematischen Fehlern, die er mit der Chromosomenanalyse teilt, eine geringere Validität besitzt als die Vergleichsmethode.

Es wurde vorgeschlagen, den Mikrokerntest mit seinen vorteilhaften Aspekten und der Möglichkeit, Spindelstörungen unmittelbarer mitzuerfassen, dennoch als sinnvolle Ergänzung der Chromosomenanalyse in die Testprogramme aufzunehmen. Mit einer entsprechend kombinierten, simultan angelegten Testung können interindividuelle Schwankungen in der Pharmakokinetik der Testtiere, die sonst den methodischen Vergleich stören würden, aufgefangen, Validität und Reliabilität heraufgesetzt und die Sicherheit der Beurteilung von Testsubstanzen hinsichtlich ihrer Mutagenität wesentlich erhöht werden.

VIII. Literaturverzeichnis

(Die mit einem +) gekennzeichneten Arbeiten lagen als abstracts in den "Endoxan-Sammelreferaten" der ASTA-Werke, Band 4 - 15, vor.)

+) Arlacon, R. A. u. Meienhofer, J.: Bildung des zytostatischen Aldehyds Acrolein beim Endoxan-Abbau in vitro.
Nature New Biology 233 (1971) 250 - 252

Bauknecht, Th., Vogel, W., Bayer, U. and Wild, D.: Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow.
Hum. Genet. 35 (1977) 299 - 307

Begemann, H. und Rastetter, J.: Atlas der Klinischen Hämatologie.
Springer, Berlin 2. Auflage (1972)

Bessis, M. : Livingblood cells and their ultrastructure.
Springer 1. Auflage (1973) 85 ff, 110 - 140, 191 - 197

Boller, K. und Schmid, W.: Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon.
Humangenetik 11 (1970) 35 - 54

Brewen, J.G. and Preston, R.J.: Cytogenetic effects of environmental mutagens in mammalian cells and the extrapolation to man.
Mut. Res. 26 (1974) 297 - 305

+) Brittinger, D.: Die mutagene Wirkung von Endoxan bei der Maus.
Humangenetik 3 (1966) 156 - 165

+) Brock, N. und Hohorst, H.-J.: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro.
Arneim.Forsch. 13 (1963) 1021 - 1031

Carrano, A.V. and Heddle, J.A.: The fate of chromosome aberrations.
J. theor. Biol. 38 (1973) 289 - 304

Carrano, A.V., Minkler, J. and Piluso, D.: On the fate of stable chromosomal aberrations.
Mut. Res. 30 (1975) 153 - 156

+) Connors, Th.A., Cox, P.J., Farmer, P.B., Forster, A.B. und Jarman, M.: Einige Untersuchungen über die durch mikrosomalen Metabolismus gebildeten aktiven Zwischenprodukte von Cyclophosphamid und Ifosfamid.
Biochem. Pharmacol. 23 (1974) 115 - 129

Drake, J.W. and Baltz, R.H.: The biochemistry of mutagenesis.
Ann. Rev. Biochemistry 45 (1976) 11 - 37

+) Druckrey, H.: Theoretische Anwendung von Zytostatika in der Therapie des Karzinoms.
Kanser (Ankara) 1 (1969) 131 - 149

Engelhardt, G.: Vergleichende Untersuchungen zur Sensibilität von Knochenmark, Lymphozyten und Spermatogonien des Chinesischen Hamsters gegenüber Butyl-Nitroso-Harnstoff
Dissertation Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg (1975)

Evans, H.J., Neary, G.J. and Williamson, F.S.: The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. II. Chromosome damage: the production of micronuclei.
Int. J. Rad. Biol. 3 (1959) 216 - 229

Gebhart, E.: Experimentelle Beiträge zum Problem der lokalen Achromasien (Gaps).
Humangenetik 13 (1971) 98 - 107

German, J. an Crippa, L.P.: zitiert in:
Schroeder, T.M. (1970) s.u.

Goetz, P. and Šram, R.J.: Micronucleus test and frequency of chromosomal aberrations in mammals and man.
Mut. Res. 29 (1975) 198 (abstract)

+) Hansmann, I.: Chromosomen-Aberrationen bei Metaphase II-Oozyten. Stadium sensibilität bei der Maus-Oogenese gegen Amethopterin und Cyclophosphamid.
Mut. Res. 22 (1974) 175 - 191

Hedile, J. A.: A rapid in vivo test for chromosome damage.
Mut. Res. 18 (1973) 187 - 190

+) Helge, H., Neubert, D., Bass, R. und Brock, N.: Einfluß von Cyclophosphamid auf die RNS-Synthese in Zellkernen und Mitochondrien.
Arch. exp. Path. Pharm. 253 (1966) 44

+) Helge, H., Oberdisse, E. und Engels, K.: Hemmbarkeit der DNS-Polymerasen in Zellkernen und Mitochondrien von Leber - und Tumorgewebe durch Cyclophosphamid.
Arch. exp. Path. Pharm. 260 (1968) 139 - 140

Herwig, M.: Vergleichende Mutagenitätsprüfung von drei Cyclophosphamiden
Dissertation Med.Fakultät Heidelberg (1973)

Ikeuchi, T.: Chromosome pulverization in Chinese hamster multinucleate cells induced by bleomycin and cytochalasin B
Japan. J. Genet. 48 (1973) 391 - 405

Ikeuchi, T., Weinfeld, H. and Sandberg, A.A.: Chromosome pulverization in micronuclei induced by tritiated thymidine.
J. Cell. Biol. 52 (1972) 97 - 104

Jenssen, D.S.: Chromosomal damage induced by some aminoacridines in mouse bone marrow cells.
European Environmental Mutagen Society (EEMS), 4th Annual Meeting Heidelberg (1974) (abstract)

Kaufmann, E. und Staemmler, M.: Knochenmark-Insuffizienz in: Lehrbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie Bd. I/1 Berlin 11. u. 12. Auflage (1955) 469 - 470

+) Klinke, F., Liss, E. und Palme, G.: ^{3}H-Endoxan: Verteilungskinetik und DNS-Bindung. 2. Jahrestag. d. Gesellschaft für Nuclearmedizin in Heidelberg (1964) 47 - 53

+) Köhler, E. und Merker, H.-J.: Wirkung der Cyclophosphamid-Vorbehandlung gravider Tiere auf die Aktivität der Kern-DNS-abhängigen RNS-Polymerasen in verschiedenen Teilen des Rattenembryos. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 277 (1973) 71 - 88

Kühböck, J., Pokorny, D., Steinbach, K. u. Eggerth, G.: Polychemotherapie maligner Tumoren und Hämoblastosen. Wien. Zschr. inn. Med. 49 (1968) 449 - 461

Kürten, S. und Obe, G.: Premature chromosome condensation in the bone marrow of Chinese hamsters after application of bleomycin in vivo. Mut.Res. 27/2 (1975) 285 - 294

Kundel, D.W. and Nies, B.A.: zitiert in: Boller, K. und Schmid, W. (1970) s.o.

+) Kummer, D.: Zytostatika-Sensibilitätstest solider, maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens. Z. Krebsforsch. 76 (1971) 124 - 139

Lampert, F.: Morphologische und quantitativ cytochemische Veränderungen der normalen menschlichen Knochenmarkzelle durch Cytostatika. Z. ges. exp. Med. 114 (1967) 189 - 202

Lea, D.E.: zitiert in: Savage, J.R.K. (1975), s.u.

+) Liss, K., Schmidt, H., Schaumlöffel, E. u. Palme, E.: Alkylierung der DNA verschiedener Tumorzellarten nach in vivo Gabe von Cyclophosphamid. Z. Krebsforsch. 80 (1973) 239-245

Matter, B.E.: Failure to detect chromosome damage in bone-marrow cells of mice and Chinese hamsters exposed in vivo to some ergot derivatives. J. Int. Med. Res. 4 (1976) 382 - 392

Matter, B.E. and Grauwiler, J.: Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. Mut. Res. 23/2 (1974) 239 - 249

Matter, B.E., Jaeger, I. and Grauwiler, J.: The relationship between the doses of various chemical mutagens required to induce micronuclei in mouse bone marrow and their lethal doses. (Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity, Vol. XV) Excerpta Medica Amsterdam ICS 311 (1974) 275 - 279

Matter, B.E. and Schmid, W.: Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. Mut. Res. 12 (1971) 417 - 425

McLeish, J.: Localised chromosome breakage. Heredity 8 (1954) 385 - 407

Miller, R.C.: The micronucleus test as an in vivo cytogenetic method. Environmental Health Perspectives (1973) 167 - 170

Müller, D., Fritz, H., Langauer, M. and Strasser, F.F.: Nucleus anomaly test and chromosomal analysis of bone marrow cells of the Chinese hamster and dominant lethal test in male mice after treatment with fluorescent whitening agents. In: Environmental quality and safety, Suppl.Vol.IV, F.Coulston, F.Korte, eds. (1975) 247 - 263

Müller, D., Langauer, M., Rathenberg, R., Strasser, F.F. und Hess, R.: Mikrokerntest sowie Chromosomenuntersuchung an somatischen und gonosomalen Zellen des Chinesischen Hamsters nach Cyclophosphamidgabe. Verh. Dtsch. Ges. Path. 56 (1972) 381 - 384

Müller, F. und Seifert, O.: Methodik der Blutzelluntersuchung. In: Taschenbuch der Medizinisch-Klinischen Diagnostik. Bergmann, München, 69.Aufl. (1966) 573 - 574

+) Murthy, V.V., Becker, B.A. und Steele, W.J.: Wirkungen von Dosierung, Phenobarbital und 2-Diäthylaminoäthyl-2,2-diphenylvalerat auf die Bindung von Cyclophosphamid und/oder seinen Metaboliten an DNS, RNS und Protein des Embryos und der Leber gravider Mäuse. Cancer Res. 33 (1973) 664 - 670

Nagl, W.: Mitotischer Zyklus. In: Chromosomen. Struktur, Funktion und Evolution. Abriß der klassischen und molekularen Karyologie. Goldmann, München, 1.Aufl (1972) 70 - 92

+) Nasjleti, C.E. und Spencer, H.H.: Chromosomen-Polyploidie in menschlichen Leukozytenkulturen, die mit Streptonigrin und Cyclophosphamid behandelt wurden. Cancer 20 (1967) 31 - 35

Nichols, W.W., Moorhead, P. and Brewen, G.: Chromosome methodologies in mutation testing. Report of the Ad hoc Commitee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. Toxicol. Appl. Pharmacol. 32 (1972) 269 - 275

+) Palme, G., Liss,E., Oeff, K. und Platis, A.: Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Desoxyribonucleinsäure-Synthese von normalen proliferierenden Zellen sowie Aszites-Tumorzellen. Arzneim. Forsch. 13 (1963) 1034 - 1039

+) Pantarotto,C. Bossi, A., Belvedere, G., Martini, A., Donelli, M.G. und Frigerio, A.: Quantitative gaschromatographische Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in biologischem Material. J. pharm. Sci. 63 (1974) 1554 - 1558

+) Rathgen, G.H., Humke, W. und Heinrichs, H.: Zum Wirkungsmechanismus zytostatischer Substanzen. Chemother. 7 (1963) 33 - 47

Richardson, J.G.: A preliminary assessment of the cytogenetic affects of METEPA on mouse bone marrow using the micronucleus test. Mut. Res. 26 (1974) 391 - 394

Rick, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie Springer 3.Aufl. (1974) 11 - 86

Rieger, R. und Michaelis, A.: III. Allgemeine Interpretationen der Entstehung von chromosomalen Strukturveränderungen. in: Die Chromosomenmutationen. Jena (1967) 51 - 82

Rieger, R., Michaelis, A. and Green, M.M.:
Glossary of Genetics and Cytogenetics.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
(1976) 4. Auflage

Röhrborn, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene. Experientia Basel 16 (1960) 523 - 529

Röhrborn, G.: Biochemical mechanisms of mutation.
in: Chemical mutagenesis in mammals and man (Vogel, F. and Röhrborn, G., Eds.)
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
1. Aufl. (1970 a) 1 - 15

Röhrborn, G.: The activity of alkylating agents.
I. Sensitive mutable stages in spermatogenesis and oogenesis.
in: Chemical mutagenesis in mammals and man (Vogel, F. and Röhrborn, G., Eds.)
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
1. Aufl. (1970 b) 294 - 316

Röhrborn, G.: Correlation between mutagenesis and carcinogenesis.
Transplacental Carcinogenesis (1973)
168 - 174

Röhrborn, G. and Buckel, U.: Investigations on the frequency of chromosome aberrations in bone marrow cells of Chinese hamsters after simultaneous applications of caffeine and cyclophosphamide.
Hum. Gen. 33 (1976) 113 - 119

+) Röhrborn, G. und Vogel, F.: Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch.
Dtsch. med. Wschr. 92 (1967) 2315 - 2321

Ruppert, G.: Untersuchung der mutagenen Wirkung von Benzol am Knochenmark des Chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus) mit der Chromosomenanalyse und dem Mikrokerntest. Dissertation Med. Fakultät der Universität Düsseldorf (1977)

Sax, K.: zitiert in:
Savage, J.R.K. (1975) s.u.

Savage, J.R.K.: Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. J. Med. Genet. 12 (1975) 103 - 122

Scheid, W. and Traut, H.: Ultraviolet -microscopical studies on achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in the chromosomes of Vicia faba.
Mut. Res. 10 (1970) 159 - 161

Scheid, W. and Traut, H.: Visualization by scanning eletron microscopy of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of Vicia faba.
Mut. Res. 11 (1971) 253 - 255

+) Schleiermacher, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. II. Zytogenetische Befunde nach Behandlung mit Trenimon und Endoxan,
Humangenetik 3 (1966) 134 - 155

Schleiermacher, E.: Chromosome aberrations in mitoses and meioses in vivo
Arch. Toxikol. 28 (1971) 105 - 114

Schmid, W.: Micronucleus test.
International workshop on mutagenicity testing of drugs and other chemicals
Zürich. Workshop Manual (1972) 23 - 29

Schmid, W.: Chemical mutagen testingon in vivo somatic mammalian cells.
Agents and Actions 3/2 (1973) 77 - 85

Schmid, W.: Der Mikrokerntest.
DFG Kommission für Mutagenitätsfragen.
Mitteilung II (Mutagenitätsprüfung)
(1975 a) 53 - 61

Schmid, W. The Micronucleus Test
Mut. Res. 31 (1975 b) 9 - 15

Schmid, W., Arakaki, D.T., Breslau, N.A. and
Culbertson, J.G.: Chemical mutagenesis.
The Chinese hamster bone marrow as an
in vivo test system. I. Cytogenetic
results on basic aspects of the methodo-
logy, obtained with alkylatingagents.
Humangenetik 11 (1971) 103 - 108

Schmid, W. and Staiger, G.R.: Chromosome studies on
bone marrow from Chinese hamsters treated
with benzodiazepinc tranquilizers and
cyclophosphamide.
Mut. Res. 7 (1969) 99 - 108

+) Schmidt, C.G.: Kanzerostatischer Effekt alkylierender
Verbindungen in Beziehung zur Glykolyse
von Tumorzellen in vivo.
Z. Krebsforschung73 (1970) 223 - 238

+) Schnitger, F. u. Uehleke, H.: Der Einfluß von
Dimethylnitrosamin, Tetrachlorkohlenstoff,
Buttergelb und Cyclophosphamid auf den
Aminosäureneinbau in Fraktionen von Leber-
homogenaten nach metabolischer Aktivierung
in vitro.
Arch. Toxikol. 25 (1969) 169 - 182.

Schroeder, T.M.: Cytogenetische und cytologische Befunde
bei enzymopenischen Panmyelopathien und
Panzytopenien.
Humangenetik 2 (1966) 287 - 316

Schroeder, T.M. : Investigation of bone marrow smears. in: Chemical mutagenesis in mammals and man (Vogel, F. and Röhrborn, G., Eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1. Auflage (1970) 214 - 219

Seiler, J.P.: The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the Chinese hamster. Mut. Res. 40 (1976) 339 - 348

+) Siebert, D.: Eine neue Methode zur Testung genetisch aktiver Metabolite, Urintest mit Cyclophosphamid (Endoxan, Cytoxan) und Saccharomyces cerevisiae. Mut. Res. 17 (1973) 307 - 314

+) Sladek, N.E.: Bioassay und relative zytostatische Potenz von in vitro und in vivo erzeugten Cyclophosphamid-Metaboliten. Cancer Res. (1973) 1150 - 1158

Sobels, F.H.: Some aspects of chemical mutagenesis. Agents and Actions 3/2 (1973) 68 - 72

Stegner, I: Vergleichende Mutagenitätsuntersuchungen von drei Cyclophosphamiden am Knochenmark des Chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus) Staatsexamensarbeit an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg (1974)

Thoday zitiert in: Evans, H.J., Neary, G.J. and Williamson,F.S. (1959) s.o.

+) Tomisek, A.J., Irick, M.B. und Allan, P.W.: Synthese der Desoxyribonucleinsäure. I. Wirkung von Cyclophosphamid in vivo auf die in vitro-Aktivität des Desoxyribonucleinsäure-Synthetase-Systems sensibler und resistenter Plasmozytome. Cancer Res. 26 (1966) 1466 - 1472

Undritz, E.: zitiert in:
Boller, K. und Schmid, W. (1970) s.o.

Victor, L.: Vergleichende Untersuchung zur Sensibilität von Knochenmark und Spermatogonien des Chinesischen Hamsters gegenüber Cyclophosphamid.
Dissertation Med. Fakultät der Universität Düsseldorf (1978)

+) Völker, G., Dräger, U., Peter, G. und Hohorst, H.-J.: Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid und 4-Hydroxyperoxy-Cyclophosphamid mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.
Arzneim. Forsch. 24 (1974) 1172 - 1176

von Ledebur, M. and Schmid, W.: The micronucleus test. Methodological aspects.
Mut. Res. 19 (1973) 109 - 117

+) Vrba, M.: Wirkung von Endoxan auf die Chromosomen von HeLa-Zellen.
Humangenetik 4 (1967) 362 - 370

Weber, E., Bidwell, K. and Legator, M.S.: An evaluation of the micronuclei test using triethylenemelamine, trimethylphosphate, hycanthone and niridazole.
Mut. Res. 28 (1975) 101 - 106

Weicker, H.: Die Mutation als pathologisch-physiologisches Phänomen der Vererbung.
in: Siegenthaler, W. Klinische Pathophysiologie. Thieme, Stuttgart
2. Auflage (1973) 10 - 24

Wellhörner, H.H.: DNA-wirksame Tumorhemmstoffe
in: Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
1. Auflage (1975) 88 - 90

+) Wenzel, R.: Untersuchungen zur Wirkungsweise alkylierender Zytostatika: Einfluß auf das Verhalten der Desoxyribonucleoproteine bei der trägerfreien Elektrophorese . Dissertation Göttingen (1970)

+) Wheeler, G.P. und Alexander, J.A.: Wirkungen von Stickstoff-Lost und Cyclophosphamid auf die DNS-Synthese in vivo und in zellfreien Zubereitungen. Cancer Res. 29 (1969) 98 - 109

+) Wheeler, G.P. und Stephens, Z.H.: Untersuchungen mit Losten. VII. Wirkungen alkylierender Substanzen in vitro und in vivo auf die thermischen Eigenschaften von Desoxyribonucleinsäuren aus empfindlichen und resistenten Plasmazytomen. Cancer Res. 25 (1965) 410 - 416

Wild, D.: Effects of indirect mutagens and carcinogens in the micronucleus test on mouse bone marrow. Mut. Res. 38/2 (1976) 105 (abstract)

Witkowski, R. and Anger, H.: Premature chromosome condensation in irradiated man. Hum. Genet. 34 (1976)65 - 68

Herrn Prof. Dr. G. R ö h r b o r n
danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die freizügige Bereitstellung von Arbeitsplatz, Materialen und Tieren am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf und die zum Teil zeitraubende Betreuung bei der schriftlichen Niederlegung der gewonnenen Ergebnisse.

Ebenso bin ich Herrn Dr. A. B a s l e r
für Korrekturlesen und zahlreiche Anregungen zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Name:	Stephan A. Th. M o h r
geboren:	30. 7. 1951
in:	Brilon Wald
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Heinrich Mohr techn. Bundesbahn-Amtmann im Ruhestand
	Frieda Mohr, geb. Brunner Hausfrau
Geschwister:	2 Schwestern (geb. 1941 und 1956)
	1 Bruder (geb. 1948)
Ehefrau:	Ulrike Mohr, geb. Grambow Lehrerin

Werdegang:

1958 - 1961	Domschule Minden
1961 - 1962	Kreuzschule Neuss
1962 - 1970	Staatl. Quirinus-Gymnasium Neuss
1970 - 1971	Stabsmusikkorps der Bundeswehr, Siegburg
ab 1972	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
1973	Vorphysikum
1974	Physikum
1976	Staatsexamen, Teil I
1978	Staatsexamen, Teil II
1979	Staatsexamen, Teil III

Fotodruck Mainz, 5100 Aachen, Neupforte 13, Nähe Markt, Telefon (02 41) 2 73 05